



DOUGLAS BARDUCHE

**PROTEÓLISE EM SEMENTES DE ANGICO
(*Anadenanthera colubrina*) NA GERMINAÇÃO**

LAVRAS – MG

2015

DOUGLAS BARDUCHE

**PROTEÓLISE EM SEMENTES DE ANGICO (*Anadenanthera colubrina*)
NA GERMINAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia / Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

Coorientador

Dr. Wagner Alves de Souza Júdice

LAVRAS – MG

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Barduche, Douglas

Proteólise em sementes de Angico (*Anadenanthera
colubrina*) na germinação / Douglas Barduche. – Lavras :
UFLA, 2015.

78 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador(a): Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. Peptidases. 2. Germinação. 3. Lenhosa Tropical. 4.
Leguminosas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

DOUGLAS BARDUCHE

**PROTEÓLISE EM SEMENTES DE ANGICO (*Anadenanthera colubrina*)
NA GERMINAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia / Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 7 de novembro de 2014.

Dr ^a . Maria Laene Moreira de Carvalho	UFLA
Dr. José Marcio de Rocha Faria	UFLA
Dr. Anderson Cleiton José	UFLA
Dr. Wagner Alves de Souza Júdice	UMC

Orientador
Dr. Renato Mendes Guimarães

LAVRAS – MG

2014

Entre o início e o fim deste trabalho, foram-se quinze anos de vida. Muitos deles, bastante conturbados. Seria justificável uma desistência. Mas creio que Deus não deixou. Uma crise constante de consciência colocou-me em dívida comigo mesmo.

De que valeria, para mim, o sofrimento da minha valente e frágil esposa e dos nossos pequenos filhos, se a dedicação que lhes neguei terminasse em nada? E a angustiada esperança de meus velhos pai e mãe?

De que valeria o trabalho de meus professores e técnicos? Para mim, por quê a existência das Universidades? Da Ciência?

De que valeria até a fome dos marginalizados, desse nosso país tão injusto, se eu não terminasse o trabalho para o qual me foram destinados recursos públicos já tão dilapidados? Faria eu coro aos dilapidadores?

Terminar esse trabalho, pacifica minha alma. Ações de Deus.

Não fosse por tudo isso, terminar esse trabalho já valeria apenas e simplesmente para apresenta-lo

Ao meu pai, Mário e minha mãe, Guiomar,

*a quem, de coração,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa, de Minas Gerais, pela bolsa concedida no início do trabalho e ao Instituto Nacional de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, nas pessoas do Dr. Luís Juliano, que acolheu meu trabalho ao Laboratório de Biofísica; e do Dr. Wagner Alves de Souza Júdice, que ajudou demais nos principais ensaios experimentais.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras e ao seu Departamento de Agricultura, nas pessoas do Pró-reitor de Pós-graduação, Dr. Mozart José de Brito; do Coordenador do Programa de Pós-graduação em Agronomia, Dr. Moacir Pasqual, que valorizaram minha intenção de retorno ao doutorado e viabilizaram o acordo pelo qual o retorno foi possível; dos professores das disciplinas que cursei, que aderiram desprendidamente, todos, a esse acordo; e da Marli, que sempre foi atenciosa e prestativa nas questões administrativas.

Especialmente, sou muito grato à Dr^a. Maria Laene Moreira de Carvalho e ao Dr. Renato Mendes Guimarães, facilitadores fantásticos para casos difíceis... pacientes e libertários.

Um grande obrigado aos amigos Dr. Luciano, Ms. Luís Gustavo e Dr. Evaristo que, nessa ordem, foram os que mais me *atormentaram* para terminar o doutorado. Especial ao Luciano, cujo estímulo vai além da amizade.

À minha abnegada irmã, Deise; aos meus incondicionais pai e mãe; e à minha querida esposa, Kátia, agradeço sem saber dizer como e quanto.

Obrigado a todos que estão no meu navio.

... há uma inteligência ali!

Joseph Campbell, se referindo aos movimentos da matéria e usando como exemplo a maquinaria bioquímica das plantas captando luz do Sol.

A beleza existe nos olhos de quem a vê. Não nas coisas.

Deus também.

RESUMO

A hidrólise das reservas proteicas é um processo central da germinação. Coordenado pela atividade sequencial e tecido-específica de diferentes peptidases, esse processo proteolítico fornece suprimento constante de aminoácidos para o pleno desenvolvimento do eixo embrionário em plântula. Estas enzimas são um grupo ancestral de proteínas que evoluíram separadamente numa vasta diversidade estrutural e funcional. Virtualmente, participam de todos os processos celulares dos seres vivos e têm larga aplicação na medicina, farmácia e indústria. No entanto, os modelos explicativos dos mecanismos proteolíticos da germinação foram obtidos de estudos quase restritos a algumas espécies de valor econômico, cultivadas há bastante tempo, sob constante processo de melhoramento genético. Isso implica em cautela sobre as generalizações feitas a partir desses modelos, bem como limita o conhecimento biológico sobre o reino vegetal e o potencial de uso tecnológico de peptidases vegetais. Neste trabalho foi realizada uma varredura da atividade proteolítica em sementes germinantes de uma espécie lenhosa leguminosa selvagem – *Anadenanthera colubrina* (Angico). Usando espectrofluorometria e cromatografia líquida de alta eficiência, associadas a substratos peptídicos fluorescentes e inibidores de peptidases, pelo menos nove atividades de peptidases relacionadas às classes aspartil, cisteíno, serino e metalo foram detectadas e quantificadas em extratos proteicos brutos, obtidos do eixo embrionário e dos cotilédones excisados antes, durante e depois da germinação. A ocorrência e intensidade dessas atividades variaram no tempo e entre tecidos. Dentre as atividades detectadas, obteve-se a indicação de que aspartil-endopeptidases vegetais (fitopepsinas) e cisteíno-carboxipeptidases (catepsinas-B vegetais) estão envolvidas na hidrólise das reservas proteicas de *A. colubrina*, o que difere das peptidases comumente envolvidas na hidrólise das reservas das leguminosas cultivadas. Além disso, uma das fitopepsinas detectadas mostrou estabilidade na escala de pH, o que é importante para usos industriais. Estas peptidases devem ser isoladas para que estudos estruturais e funcionais confirmem ou não esses indícios. No entanto, com os dados obtidos do Angico, se evidencia a importância biológica e tecnológica de estender os estudos relativos a peptidases vegetais sobre uma base genética mais diversificada. No sentido de estímulo a esse propósito, a metodologia aqui empregada permitiu a detecção ampla de peptidases em conjuntos independentes de amostras, o que permitiria, por exemplo, estudos comparativos entre diferentes espécies.

Palavras-chave: Peptidases. Germinação. Lenhosa tropical. Leguminosas.

ABSTRACT

Protein reserves hydrolysis is a central process of germination. Coordinated by different peptidases that act sequentially and overlaid mode, this proteolytic process provides a steady supply of amino acids to the full development of the embryo into seedling. These enzymes are an ancient group of proteins that have evolved separately in a wide structural and functional diversity. They virtually participate in all cellular processes of living beings and have wide applications in medicine, pharmacy and industry. However, the explanatory models of the germination proteolytic mechanisms were obtained from studies almost restricted to a few plant species, cultivated for a long time, under constant genetic improvement. This narrow genetic basis imply caution about generalizations made from these models, as well restricts the biological knowledge about the plant kingdom and the technological use of plant peptidases. In this work, a scan of the proteolytic activity was held in germinating seeds of a leguminous woody tree – Angico (*Anadenanthera colubrina*). By using spectrofluorometry and high pression liquid chromatography, combined with fluorescent peptide substrates and peptidase inhibitors, at least nine peptidase activities related to the classes of aspartyl-, cysteine-, serine- and metallo-peptidases were detected and quantified in crude protein extracts of the embryonic axis and the cotyledons excised before, during and after germination. The occurrence and intensity of these activities varied over time and between these tissues. Among the activities detected, there was indication that aspartyl-endopeptidases (phytopepsins) and cysteine-carboxypeptidases (plant cathepsins-B) are involved in the hydrolysis of *A. colubrina* protein reserves, which differ from the peptidases involved in commonly cultivated legumes. In addition, one of the phytopepsins detected showed stability on the pH scale, which is important for industrial uses. These peptidases must be isolated so that structural and functional studies could confirm these indications. However, with the data obtained from Angico, the biological and technological importance of extending the studies on plant peptidases on a diverse genetic basis is evident. In this regard, the methodology used allowed a wide detection of peptidases on independent sets of samples, which would allows, for example, comparisons between different species.

Keywords: Peptidases. Germination. Tropical woody tree. Leguminous plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estrutura das proleguminas	30
FIGURA 2	Fragmentos da hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH detectados por HPLC	49
GRÁFICO 1	Atividade proteolítica detectada com Abz-AIAFFSRQ-EDDnp	44
GRÁFICO 2	Atividade proteolítica detectada com Abz-FRAK(Dnp)-OH	48
GRÁFICO 3	Atividade proteolítica detectada com F-MCA	55
GRÁFICO 4	Atividade proteolítica detectada com Z-FR-MCA	58
QUADRO 1	Classificação de peptidases com base na classe catalítica e origem evolucionária	24
TABELA 1	Classes de peptidases identificadas com Abz-AIAFFSRQ-EDDnp	45
TABELA 2	Classes de peptidases identificadas com Abz-FRAK(Dnp)-OH	49
TABELA 2A	Inibição da hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH quantificada por HPLC	51
TABELA 3	Classes de peptidases identificadas com F-MCA	56
TABELA 4	Classes de peptidases identificadas com Z-FR-MCA	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas dos aminoácidos

Aminoácido	3 letras	1 letra	carga
Alanina	Ala	A	não polar
Asparagina	Asn	N	polar
Ácido aspártico	Asp	D	ácido
Arginina	Arg	R	básico
Cisteína	Cys	C	polar
Fenilalanina	Phe	F	não polar
Glicina	Gly	G	polar
Glutamina	Gln	Q	polar
Ácido glutâmico	Glu	E	ácido
Histidina	His	H	básico
Isoleucina	Ile	I	não polar
Leucina	Leu	L	não polar
Lisina	Lys	K	básico
Metionina	Met	M	não polar
Prolina	Pro	P	não polar
Serina	Ser	S	polar
Tirosina	Tyr	Y	polar
Treonina	Thr	T	polar
Triptofano	Trp	W	não polar
Valina	Val	V	não polar

Abreviaturas das peptidases

aminopeptidases	aminoP
carboxipeptidases	carboxiP
endopeptidases	endoP
peptidases da classe aspartil	AP
peptidases da classe cisteíno	CP
peptidases da classe metalo	MP
peptidases da classe serino	SP

Outras abreviaturas

Abz	Ácido <i>orto</i> -aminobenzoico
DTT	Ditiotreitol
Dnp	2,4-dinitrofenil
EDDnp	n-(2,4-dinitrofenil-etilenodiamino)
E-64	l-trans-epoxisuccinil-l-leucilamido(4-guanidino)-butano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MCA	7-amino-4-metil-coumarina
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonila
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
UAF	Unidade Arbitrária de Fluorescência
UV	Ultravioleta
Z	Benzoil oxicarbonil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	A espécie.....	16
2.2	Importância das peptidases.....	17
2.3	Classificação das peptidases.....	20
2.4	Peptidases na germinação	25
2.4.1	Peptidases na hidrólise das reservas proteicas	26
2.4.1.1	Proteínas de reserva.....	27
2.4.1.2	Hidrólise das proteínas de reserva	31
3	METODOLOGIA.....	35
3.1	Material vegetal.....	35
3.1.1	Germinação e coleta de tecidos das sementes.....	35
3.1.2	Extração de proteínas	36
3.1.3	Quantificação proteica	36
3.2	Deteção da atividade proteolítica.....	36
3.3	Inibição da atividade proteolítica	38
3.3.1	Inibição quantificada por espectrofluorometria	39
3.3.2	Inibição quantificada por HPLC.....	40
3.4	Análise dos dados	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Peptidases detectadas com a hidrólise de ABZ-AIAFFSRQ-EDDNP..	43
4.2	Peptidases detectadas com a hidrólise de ABZ-FRAK(DNP)-OH	47
4.3	Peptidases detectadas com a hidrólise de F-MCA.....	54
4.4	Peptidases detectadas com a hidrólise de Z-FR-MCA	57
5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise das reservas proteicas da semente é crucial para o estabelecimento da plântula. Este processo, ativado com a hidratação da semente e ativo até depois da germinação, centraliza-se na atividade conjunta de diferentes peptidases. Estas hidrolases são expressas de modo temporal e tecido-específico: são tanto acumuladas no eixo embrionário e nos tecidos de reserva durante a maturação da semente, quanto sintetizadas durante e após a germinação. Assim, na medida em que são ativadas ou sintetizadas, estas enzimas hidrolisam sequencialmente as proteínas de reserva e fornecem suprimento contínuo de aminoácidos para o eixo embrionário em crescimento.

Os modelos explicativos desse processo proteolítico foram construídos com base nos estudos de algumas plantas de valor econômico. Porém, estas plantas são cultivadas há bastante tempo, sob constante processo de melhoramento genético. Isso implica em cautela nas generalizações sobre a proteólise na germinação feitas a partir desses modelos, ainda mais considerando a diversidade das angiospermas e a vasta diversidade estrutural e funcional das peptidases, originada de 60 linhas evolutivas separadas.

De fato, mesmo dentre essas plantas-modelo, a proteólise na germinação varia mais do que o esperado. Proteínas aparentadas evolutivamente possuem estrutura tridimensional e sítios de clivagem similares. Assim, um determinado tipo de proteína tende a ser clivado por um mesmo tipo de peptidase. No entanto, há proteínas de reserva homólogas, de espécies diferentes, que são clivadas por peptidases de tipos diferentes, específicos para cada espécie.

Outro aspecto, geral, mas também derivado da concentração da pesquisa sobre um número reduzido de espécies, é o fato de que poucas peptidases vegetais são bem conhecidas e menos ainda as aproveitadas tecnologicamente – comparadas às peptidases de mamíferos e de microrganismos, intensamente

estudadas e com muitos usos na medicina, farmácia e indústria; pois peptidases são enzimas-chave em processos celulares centrais de todos os seres vivos.

Portanto, é importante expandir a pesquisa de peptidases vegetais sobre uma base genética diversificada, tanto para ampliar o conhecimento biológico da proteólise na germinação – e de outros processos proteolíticos das plantas, quanto para explorar o uso tecnológico que peptidases vegetais podem ter.

Por outro lado, dos trabalhos com peptidases ativas na germinação, a maioria enfoca enzimas isoladas. Apesar da obrigatoriedade do uso de enzimas purificadas para determinar suas estruturas, funções específicas, relações evolutivas e aplicações tecnológicas, são raros os trabalhos que exploram a germinação em relação ao conjunto de sua atividade proteolítica.

Nesse contexto, o objetivo neste trabalho foi realizar uma varredura da atividade proteolítica em sementes germinantes de uma espécie lenhosa selvagem, nativa do Brasil: *Anadenanthera colubrina* (Angico).

Há pouca informação bioquímica sobre a germinação das importantes espécies lenhosas para o clímax ecológico da maioria dos ecossistemas terrestres, principalmente das espécies nativas. Além disso, Angico tem importância farmacológica, fitogeográfica, antropológica e vantagens experimentais que lhe conferem características de planta-modelo para lenhosas: é uma leguminosa que apresenta sementes ortodoxas com alta, rápida e uniforme taxa de germinação, alto teor de proteínas de reserva e facilidade para separar o eixo embrionário dos cotilédones.

A partir disso, usou-se espectrofluorometria e cromatografia líquida de alta eficiência, associadas a inibidores de peptidases e substratos peptídicos sintéticos, que emitem fluorescência quando hidrolisados por peptidases, para detectar, quantificar relativamente e caracterizar parcialmente a atividade de peptidases em extratos proteicos brutos, obtidos separadamente do eixo embrionário e dos cotilédones, excisados antes, durante e depois da germinação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan, *Fabaceae*, *Mimosoideae*, conhecida no Brasil por Angico-vermelho, Angico-branco, Angico-liso ou Monjoleiro, entre outros, é uma espécie lenhosa largamente distribuída pelos ecossistemas das regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, noroeste da Argentina, sudoeste da Bolívia, oeste dos Andes Peruanos e costa oeste do Equador. Essa extensa região é denominada Arco Pleistocênico, devido à consideração desses ecossistemas terem sido formados na Era do Pleistoceno e de serem distribuídos em forma de arco, que semicircunda pelo sul toda a Bacia Amazônica. Sendo presente em toda essa região, Angico foi destacado como paradigma em considerar o Arco Pleistocênico uma nova unidade fitogeográfica, denominada Florestas Tropicais Sazonais (PRADO, 2000).

A árvore é de grande porte e sua madeira, com densidade maior que 1, é utilizada em construções pesadas e/ou submersas. Seu uso popular o inclui na farmacopeia brasileira: sua casca é utilizada para tratar inflamações causadas por bronquites, gastrites e gripe. Estudos farmacológicos identificaram, em extratos da casca, catequinas, flavonoides, fenóis, saponinas, esteroides, taninos, triterpenos e xantonas com ação anti-inflamatória (SANTOS et al., 2013); na seiva, uma arabinogalactana com efeito imunomodulador e antitumoral contra células de Sarcoma (MORETÃO et al., 2004); e, em extratos das partes aéreas, 11 compostos e um novo flavonoide, denominado anadanthoflavona, capazes de inibir a atividade de lipoxigenases (humanas e vegetais), o que é considerado importante nas pesquisas contra o câncer, aterosclerose e doenças inflamatórias (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004).

As sementes possuem alto teor de fenóis (~600 mg/g), que são antioxidantes naturais passíveis de substituírem os sintéticos, considerados carcinogênicos, na preservação de alimentos industrializados (SILVA JÚNIOR et al., 2011) e esteroides, cujas doses inibitórias mínimas são tão efetivas quanto às doses de fungicidas comerciais no controle do fungo *Alternaria alternata* (CAMPOS et al., 2014).

As sementes também contém alto teor de bufotenina – um alcaloide com ação alucinógena, que aparentemente não penetra a barreira encefálica: sementes coletadas por Johann Natterer (1787-1843) e analisadas por Smet e Rivier (1987) ainda continham 15 mg/g de bufotenina. Devido a esse alcaloide, a espécie também tem importância antropológica. O pó das sementes é inalado em rituais religiosos dos Maué e de vários outros povos indígenas do Brasil (SMET; RIVIER, 1987). Esse uso ritual é antigo. Há toda uma iconografia, em rocha, do povo pré-colombiano Wari, do Peru (750-1000 AC), mostrando que Angico era considerado uma planta sagrada (KNOBLOCH, 2000).

2.2 Importância das peptidases

Enzimas proteolíticas (peptidases) são utilizadas de modo empírico há milênios – na *Iliada*, de Homero, se descreve o uso do látex de figueira para coalhar o leite na fabricação de queijo. Mas o interesse científico em identificar e caracterizar os compostos que permitiam a fabricação de pães, vinhos, queijos e cervejas – ou as enzimas, de modo geral, começou com a nascente Fisiologia Humana do século 18, quando Lazzaro Spallanzani, em 1783, mostrou que o suco gástrico humano digeriu carne *in vitro* e, em 1836, Theodor Schwann denominou *pepsina* a substância ativa nesse fluido. O termo *enzima* vem do grego *énzymo* (*én* = na; *zymos* = levedura, fermento) e foi sugerido por Wilhelm Friedrich Kühne, em 1876, no seu trabalho sobre um *fermento pancreático*

capaz de digerir proteínas, intitulado “*Sobre a Tripsina – Enzima do Pâncreas*” (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Atualmente, as peptidases passaram do *status* de meras enzimas degradadoras de proteínas a enzimas multifuncionais. São capazes tanto de degradar completamente proteínas de modo generalizado para reciclar aminoácidos, quanto de executar clivagens extremamente precisas para regular o destino e atividade de muitas proteínas, modular interações proteína-proteína, amplificar sinais moleculares e criar novas moléculas bioativas (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). Devido à multifuncionalidade e ao fato de representarem 2% do produto gênico dos seres vivos, considera-se que peptidases participam de todos os processos do ciclo celular (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; SCHALLER, 2004; VAN DER HOORN, 2008).

Esta diversidade funcional é reflexo da variabilidade estrutural com que essas enzimas ancestrais evoluíram. Variam de pequenas unidades catalíticas com 20 kDa a complexos aglomerados de várias subunidades com até 6 MDa (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008), oriundas de 60 linhas evolutivas separadas (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004; RAWLINGS; BARRETT, 1993; RAWLINGS; BARRETT, 1994a; RAWLINGS; BARRETT, 1994b; RAWLINGS; BARRETT, 1995a; RAWLINGS; BARRETT, 1995b).

Em humanos, alterações no mecanismo proteolítico estão na base do câncer e de doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas, o que levou a indústria farmacêutica a focar as peptidases como alvos potenciais para drogas ou como biomarcadores em diagnósticos e prognósticos (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). Além disso, muitos microrganismos patogênicos requerem peptidases na replicação gênica ou como fatores de virulência (LANFRANCO et al., 2008; MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998), o que levou a terapias baseadas no bloqueio de peptidases contra doenças como a AIDS, por exemplo,

contra a qual muitas das drogas disponíveis usam inibidores da retropepsina do HIV-1 (VERMELHO et al., 2008).

Devido à importância para a medicina, as peptidases são estudadas intensamente em mamíferos e organismos unicelulares, patogênicos ou não, o que tem gerado informações fundamentais para o conhecimento biológico dos seres vivos (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004), bem como para inúmeras aplicações biotecnológicas na pesquisa e na indústria (VERMELHO et al., 2008) – peptidases representam 60% de todas as enzimas de uso comercial (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).

Porém, comparado ao conhecimento que se tem sobre a estrutura e função de muitas peptidases humanas, virais e bacterianas, peptidases vegetais são quase desconhecidas, apesar da anotação de mais de 850 genes para peptidases em *Arabidopsis* (RAWLINGS et al., 2014).

No entanto, avanços importantes estão ocorrendo. A caracterização estrutural de peptidases vegetais, bem como análises da expressão gênica de mutantes para algumas dessas enzimas, estão mostrando o envolvimento direto de peptidases em processos essenciais do ciclo de vida vegetal, como, por exemplo, meiose, embriogênese, deposição da cutícula foliar, gênese e desenvolvimento dos estômatos e dos cloroplastos ou respostas de defesa locais e sistêmicas (VAN DER HOORN, 2008), tanto por serem capazes de fazer clivagens seletivas em modificações pós-traducionais, que resultam em direcionamento celular, em estruturação tridimensional ou em maturação de proteínas e de enzimas regulatórias, quanto clivagens não-seletivas, no *turn-over* de proteínas necessário em processos-chave do crescimento, desenvolvimento e defesa vegetal centralizados no complexo proteolítico proteassômico (HELLMANN; ESTELLE, 2002; MORRIS et al., 2011; SCHALLER, 2004).

Além disso, o mecanismo de hidrólise inicial das globulinas de reserva por peptidases de sementes chamou a atenção de imunologistas e biólogos

vegetais para o fato de que essa hidrólise gera epitopos alergênicos do mesmo modo que o trato digestivo humano, bem como de biotecnologistas, no sentido de que a falha em prever a ação de peptidases causou a hidrólise de proteínas clonadas em sementes (TAN-WILSON; WILSON, 2012).

Por outro lado, o conhecimento sobre peptidases vegetais foi obtido a partir da estreita base genética das plantas cultivadas, o que implica numa limitação aos modelos explicativos da proteólise em sementes durante a germinação (TAN-WILSON; WILSON, 2012), bem como ao eventual uso farmacológico (SALAS et al., 2008) e tecnológico (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011) que peptidases vegetais podem ter.

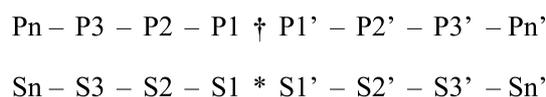
2.3 Classificação das peptidases

Peptidases, proteases e proteinases são denominações utilizadas normalmente como sinônimas para as enzimas proteolíticas. No entanto, o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) recomenda o termo PEPTIDASE como o “termo geral para todas as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas” (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2014).

Segundo esse comitê, as *peptidases* pertencem à subclasse das *hidrolases* e são divididas entre *endopeptidases*, quando hidrolisam a cadeia polipeptídica internamente e *exopeptidases*, quando hidrolisam a cadeia no terminal amina (N-terminal) ou no terminal carboxila (C-terminal). As exopeptidases que clivam no N-terminal, liberam um (*aminopeptidases*), dois (*dipeptidil-peptidases*) ou três (*tripeptidil-peptidases*) resíduos aminoacídicos e as que clivam no C-terminal livre, liberam um (*carboxipeptidases*) ou dois resíduos (*peptidil-dipeptidases*). Outras são específicas para dipeptídios (*dipeptidases*) ou para remover resíduos que são substituídos ou circularizados

(*ômega-peptidases*). Endopeptidases que não hidrolisam proteínas, mas polipeptídeos com até 30 resíduos aminoacídicos, são classificadas como *oligopeptidases*, das quais são excluídas amino e carboxipeptidases.

Porém, a especificidade das peptidases não se restringe à região de clivagem da cadeia polipeptídica ou ao tamanho dela: possuem seletividade quanto aos aminoácidos da ligação sésil (ligação que é clivada na molécula do substrato), bem como às sequências adjacentes à região de clivagem. Desse modo, são reconhecidos sítios e subsítios de atividade na caracterização de peptidases, cujas descrições de especificidade seguem o seguinte esquema:



Onde o símbolo ‘ \dagger ’ marca a ligação sésil no substrato proteico (P) e o símbolo ‘*’ marca o sítio catalítico da enzima (S), os subsítios da enzima são numerados de S1 até Sn no sentido N-terminal e de S1’ até Sn’ no sentido C-terminal, enquanto que, respectivamente, os resíduos do substrato que os subsítios da enzima acomodam são numerados de P1 até Pn e de P1’ até Pn’.

A grande variedade de especificidades posicionais dificulta um sistema de classificação único. Assim, as peptidases também são classificadas quanto à natureza química do grupo de aminoácidos responsável pela catálise (classe ou tipo catalítico).

Os tipos catalíticos são determinados em função dos resíduos aminoacídicos presentes no sítio catalítico da enzima e foram estabelecidos por Hartley (1960) em: *Aspartil*, *Cisteíno*, *Metalo* e *Serino*. As aspartil-peptidases (APs) possuem no sítio ativo dois resíduos de ácido aspártico envolvidos diretamente no processo catalítico; as cisteíno-peptidases (CPs), um de cisteína; as serino-peptidases (SPs), um de serina; e as metalo-peptidases (MPs), um íon

metálico, geralmente Zn^{2+} , indispensável ao seu mecanismo catalítico (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004).

Com os avanços na caracterização química, bioquímica e estrutural das peptidases, foi estabelecido um terceiro sistema de classificação baseado na filogenia dessas enzimas. Esse sistema, adotado no banco de dados de peptidases MEROPS [<http://merops.sanger.ac.uk>] (RAWLINGS et al., 2014), foi desenvolvido por Rawlings e Barrett (1993), Rawlings e Barrett (1994a), Rawlings e Barrett (1994b), Rawlings e Barrett (1995a) e Rawlings e Barrett (1995b) a partir da análise das sequências aminoacídicas de 600 peptidases. Dessa análise foi reconhecida a existência de pelo menos 60 linhas evolucionárias separadas.

Nessa classificação, peptidases com as mesmas propriedades funcionais e significativa homologia na sequência de aminoácidos da região catalítica são organizadas em *famílias*. O conjunto de famílias com a mesma origem evolucionária forma um *clã* (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Em uma família, são agrupadas as peptidases cuja sequência primária de aminoácidos da região catalítica apresenta relação estatística significativa com a sequência do membro representativo da família, denominado *exemplo-tipo*, ou a um outro membro que já tenha sido relacionado ao exemplo-tipo. Essa relação deve ser restrita à região catalítica, porque muitas peptidases contêm domínios não-catalíticos comuns a outros grupos de proteínas. Membros de uma mesma família derivam de um ancestral comum e são definidos como *enzimas homólogas* (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Um clã comporta uma ou mais famílias cujos membros parecem derivar de um único ancestral, mas divergiram de tal maneira que sua relação por comparação da estrutura primária não pode ser comprovada. Desse modo, a maior evidência de homologia dentro de um clã é a similaridade das estruturas tridimensionais, embora o arranjo dos resíduos catalíticos e limitadas

similaridades na sequência de resíduos ao redor dos resíduos catalíticos também sejam evidenciadores (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Na nomenclatura desse sistema de classificação, os tipos catalíticos são designados pelas suas respectivas letras iniciais: Aspartil (A), Cisteíno (C), Metaló (M), Serino (S), Treonino (T) e Não-Classificado (U; de *Unclassified*).

Os clãs, famílias e peptidases são designados por *identificadores*. O identificador de um clã é composto pela letra que denota o tipo catalítico (A, C, M, S, T ou U) seguida por uma letra serial (A, B, C etc), enquanto que o de uma família é composto pela letra do tipo catalítico seguida por um número serial. Por exemplo, dentro do tipo catalítico das metalo-peptidases, estão alocados os clãs MA, MB, MC etc, cada qual com suas famílias M1, M2, M3 etc. O identificador de uma peptidase é composto por duas partes separadas por um ponto. A primeira refere-se à sua família e a segunda por um número serial de três dígitos. Por exemplo, a Pepsina A, exemplo-tipo do clã AA das aspartil-peptidases, é identificada por A01.001.

Peptidases ainda não sequenciadas não são alocadas numa família e recebem um identificador provisório, composto pela letra do seu tipo catalítico seguida, sempre, pelo número “9” e por uma terceira letra que denota o tipo de clivagem: A (aminopeptidase), B (dipeptidase), C (dipeptidil- ou tripeptidil-peptidase), D (peptidil-dipeptidase), E (carboxipeptidase), F (ômega-peptidase) e G (endopeptidase). A segunda parte do identificador é também um número serial. Por exemplo, A9G.001, designa uma aspartil-endopeptidase.

Até a realização da estrutura cristalográfica do proteossoma de levedura, apenas os quatro tipos catalíticos estabelecidos por Hartley (1960) eram conhecidos. A cristalografia mostrou que o proteossoma é um complexo proteolítico com várias subunidades que determinam várias atividades proteolíticas, mas cujas estruturas individuais não são similares às estruturas das outras peptidases, bem como mostrou que um resíduo N-terminal de treonina

pode ser o nucleófilo na hidrólise de uma ligação peptídica (KISSELEV; KAGANOVICH; GOLDBERG, 2002; ORLOWSKI, 1990; RECHSTEINER; HOFFMAN; DUBIEL, 1993; RIVETT, 1993; ZWICKL et al., 1992). Assim, o proteassoma está inserido na classe das hidrolases N-terminal nucleofílico (hidrolases Ntn). Os resíduos N-terminais dessa classe podem ser cisteína ou serina, além da treonina e, no banco de dados MEROPS (RAWLINGS et al., 2014), formam um clã cujo identificador é iniciado pela letra “P”. Desse modo, uma serino-peptidase do clã PA (ou PB, PC etc) está contida no subclã PA(S); uma cisteína, no subclã PA(C); uma treonina no PA(T); e assim por diante.

No Quadro 1 estão listadas as classes catalíticas com alguns de seus clãs, famílias e exemplos-tipo de peptidases.

QUADRO 1 Classificação de peptidases com base na classe catalítica e origem evolucionária.

clã	exemplo-tipo
ASPARTIL-PEPTIDASES	
AA	Pepsina
CISTEÍNO-PEPTIDASES	
CA	Papaína
CB	Endopeptidases virais quimotripsina-símile
CC	Endopeptidases virais papaína-símile
METALO-PEPTIDASES	
MA	Termolisina
MC	Metalocarboxipeptidase
MF	Leucil aminopeptidase
SERINO-PEPTIDASES	
SA	Tripsina
SC	Carboxipeptidase C
HIDROLASES N-TERMINAL NUCLEOFÍLICO	
PB(T)	componente β do proteassoma de arqueobactéria (<i>Thermoplasma acidophilum</i>)
PB(C)	precursor da glutamina fosforibosil pirofosfato amido transferase (<i>H. sapiens</i>)
PB(S)	precursor da penicilina acilase (<i>Escherichia coli</i>)

2.4 Peptidases na germinação

A germinação de sementes ortodoxas é um processo desencadeado pela absorção de água. A partir da hidratação, ocorrem alterações do estado fisiológico da semente que resultam na retomada do desenvolvimento do embrião, paralisado durante a dessecação da semente. Essas alterações são complexas e convergem para a ativação e síntese de hidrolases que degradam as macromoléculas de reserva e fornecem monômeros para o eixo embrionário.

Inicialmente, na fase considerada germinativa, essas alterações são mais voltadas para recuperar, do estado fisiológico quiescente, desidratado, para o funcional, reidratado, os sistemas celulares de replicação, transcrição, respiração e de membranas. A síntese proteica no embrião reidratado começa já nessa fase e se intensifica na pós-germinativa, que é quando os sistemas celulares estão recuperados, a demanda por monômeros é maior e a maior parte das reservas é consumida (BEWLEY; BLACK, 1994; BEWLEY, 1997).

As plantas estocam milhares de tipos de mRNAs nas fases finais da maturação das sementes. Muitos se relacionam à proteção contra a desidratação e são considerados mensagens residuais na semente seca (BEWLEY, 1997; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010), mas muitos se relacionam a processos fisiológicos desnecessários ao processo de desidratação e são considerados estoque para o início da germinação (ANGELOVICI et al., 2010).

A síntese proteica na fase germinativa se deve mais à tradução desses mRNAs estocados do que à transcrição de novos mRNAs, mas é tão crucial para a retomada do desenvolvimento do embrião quanto à síntese *de novo* na fase pós-germinativa. Em *Arabidopsis*, o bloqueio da tradução com cicloeximida na fase germinativa interrompe totalmente a germinação, enquanto que o bloqueio da transcrição com α -amanitina apenas a retarda (RAJJOU et al., 2004).

Isso indica que o suprimento de aminoácidos para eixo embrionário deve ser contínuo e, conseqüentemente, demonstra a importância da hidrólise das reservas proteicas nesse processo.

De fato, sementes estocam tanto peptidases em suas formas inativas, junto às proteínas de reserva, quanto mRNAs para peptidases (BEWLEY, 1997; NAKABAYASHI et al., 2005). Estas enzimas são ativadas com a hidratação da semente, bem como sintetizadas, tanto na fase germinativa, quanto na pós-germinativa, garantindo o fornecimento contínuo de aminoácidos para o eixo embrionário, desde sua reidratação até seu estabelecimento como plântula.

2.4.1 Peptidases na hidrólise das reservas proteicas

O embrião precisa de nitrogênio para estabelecer-se como plântula. Então as plantas precisam acumular aminoácidos em suas sementes para uso futuro e o meio encontrado para acumular aminoácidos solúveis em grande quantidade é polimerizando-os em cadeias osmoticamente inativas de resíduos aminoacídicos. Isso resume a única função conhecida das Proteínas de Reserva (PR). Condizentemente, PR são ricas em resíduos amidados, que lhes conferem alta razão entre nitrogênio e carbono (MÜNTZ, 1998).

Como as PR são acumuladas antes da desidratação da semente, para serem utilizadas na germinação, não devem ser degradadas prematuramente. Então são protegidas da proteólise inerente ao mecanismo do *turn-over* celular mediante armazenamento em vesículas especializadas, genericamente denominadas *corpos proteicos* (HERMAN; LARKINS, 1999; MÜNTZ, 2007).

Além de proteger, o armazenamento deve ser otimizado. Consoante, as PR são, na maioria, estruturas oligoméricas compactas, que tanto concentram grande quantidade de aminoácidos, quanto restringem o acesso de peptidases.

Na germinação, essas compactas estruturas devem ser desmontadas. Inicialmente, peptidases estocadas junto às PR nos corpos proteicos, ativadas com a hidratação – ou sintetizadas *de novo* e transportadas para o corpo proteico, realizam clivagens seletivas na molécula. Isso altera a estrutura da PR e a expõe ao acesso de segundas peptidases, também estocadas ou sintetizadas, mas inativas contra a estrutura nativa da PR. A partir daí, ambos tipos de peptidases, em ação conjunta a outros, citoplasmáticos, clivam extensivamente a cadeia polipeptídica até aminoácidos solúveis, destinados ao eixo embrionário (SHUTOV; VAINTRAUB, 1987).

2.4.1.1 Proteínas de reserva

Proteínas de reserva (PR) são comumente conhecidas com base na solubilidade em água (albuminas), fracas soluções salinas (globulinas), alcoólicas (prolaminas) e acídicas ou alcalinas (glutelinas). Porém, a classificação com base na solubilidade nem sempre reflete as relações evolutivas baseadas nas sequências de aminoácidos e/ou nas estruturas tridimensionais – e é a estrutura, não a solubilidade, que determina como as PR são processadas e estocadas durante a maturação da semente e como são hidrolisadas durante a germinação (MÜNTZ; 1998; TAN-WILSON; WILSON, 2012).

Em função da sequência, as albuminas são relacionadas à superfamília das prolaminas (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995). Prolaminas e glutelinas possuem raiz evolutiva comum, mas a glutelina do arroz (*Oryza sativa*) tem homologia estrutural com as globulinas, enquanto que as prolaminas do milho (*Zea mays*) não possuem relação conhecida com as prolaminas (MÜNTZ, 1998).

PR são membros de famílias multigênicas, variam bastante entre suas sequências (MIERNYK; HAJDUCH, 2011; TAN-WILSON; WILSON, 2012) e recebem denominações em função da classe solúvel e/ou da estrutura e/ou das

espécies – o que causa certa confusão. Exemplos são as albuminas 2S [em função do seu coeficiente de sedimentação S (Svedeberg)] napina, de *Brassica napus* e BNA, da Castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa*). Globulinas são as principais PR em dicotiledôneas e são divididas em 7S e 11S. Exemplos de globulinas 11S são: glicinina da soja (*Glycine max*), cruciferina de *Arabidopsis thaliana* e “glutelina” do arroz. De globulinas 7S: faseolina do feijão (*Phaseolus vulgaris*), convicilina da ervilha (*Pisum sativum*) e β -conglucininina da soja. De prolaminas: zeínas do milho, gliadina do trigo (*Triticum sativum*) e hordeína da cevada (*Hordeum vulgare*).

Apesar da variabilidade entre sequências, as PR têm em comum estruturas altamente compactas, que maximizam sua função de reserva, tanto pela quantidade de aminoácidos, quanto pela proteção que oferecem contra ataque prematuro de peptidases (TAN-WILSON; WILSON, 2012).

PR são processadas pós-traducionalmente por peptidases durante seu acúmulo antes da desidratação da semente e são hidrolisadas por peptidases na germinação. A resposta evolutiva diante dos requerimentos fisiológicos desses processos antagônicos foi o estabelecimento de relações estruturais entre peptidases e PR. As globulinas são um exemplo interessante disso.

Globulinas são divididas em dois grupos relacionados evolutivamente: vicilinas (7S) e leguminas (11S). Ambas apresentam domínios estruturais conservados, identificados primeiramente na proteína termoestável germina, do trigo, que remonta à proteína esferulina, induzida por estresse em fungos (SHUTOV et al., 2003; DUNWELL; PURVIS; KHURI, 2004) – o que condiz à tolerância das globulinas à desidratação. De fato, a cristalografia da prolegumina de *Amaranthus hypochondriacus* mostrou que a estrutura é termoestável (TANDANG-SILVAS et al., 2012).

A germina é um homotrímero cujos monômeros contém uma região conservada composta por um domínio α -hélice e um β -barril. Essa região é

restritiva ao acesso de peptidases. O trímero possui a forma de anel compacto e é formado por interações hidrofóbicas entre as α -hélices dos monômeros. Nos monômeros das globulinas (Figura 1), essa região germina-símile foi duplicada e separada pela inserção de uma sequência linear – que não oferece restrição estrutural ao acesso de peptidases. Vicilinas e leguminas evoluíram separadamente a partir desse evento de duplicação, de modo que as vicilinas são homo- ou heterotrímeros de vicilina e convicilina (homóloga da vicilina com um inserto N-terminal ácido de ~20 kDa), enquanto que as leguminas são hexâmeros, cujos trímeros (prolegumina) equivalem estruturalmente às vicilinas (SHUTOV et al., 2003; TANDANG-SILVAS et al., 2012).

Cada monômero da prolegumina consiste de duas cadeias (α e β) ligadas por uma ponte dissulfídrica (S-S) (SHEWRY; NAPIER; TATHAM, 1995). Os monômeros são sintetizados em cadeia única, formam-se as pontes S-S, enovelam-se hidrofobicamente na compacta estrutura trimérica (Figura 1) e então a cadeia de cada um é clivada em um único resíduo de asparagina (Asn) do inserto linear entre as regiões germina-símile. Isso resulta no trímero da prolegumina, cujos monômeros contém duas cadeias (α e β) ligadas por S-S, cada uma com um domínio germina-símile (α -hélice; β -barril).

Essa clivagem seletiva no inserto linear é realizada por uma CP com especificidade *in vitro* restrita à Asn na posição P1 – uma asparaginil-endopeptidase, denominada *legumaina* (MÜNTZ; SHUTOV, 2002). A clivagem realizada pela legumaina altera a conformação do trímero da prolegumina, o que a leva à união hidrofóbica com outra, resultando na estrutura hexamérica final da legumina, à qual a legumaina não tem acesso (SHUTOV et al., 2003).

Mutações posicionais de Asn na prolegumina resultam na degradação ou na manutenção do trímero, mostrando que a formação do hexâmero é dependente da legumaina (JUNG et al., 1998). Considera-se que o inserto da sequência linear entre os domínios germina-símile, que não oferece restrições

estruturais ao acesso de peptidases, foi o centro funcional da coevolução entre leguminas e legumaínas (SHUTOV et al., 2003).

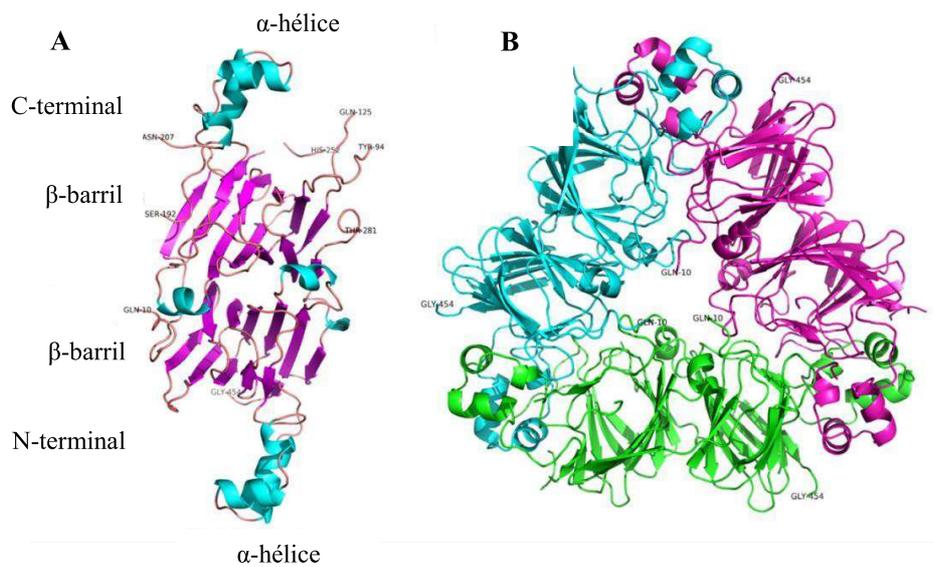


FIGURA 1 Estrutura da prolegumina. Estrutura do monômero (A) e do trímero (B) da prolegumina de *Amaranthus hypochondriacus*. Adaptado de Tandang-Silvas et al. (2012).

Além da estrutura homo- ou heterotrimérica, as vicilinas diferem das leguminas por serem glicolisadas e não possuírem pontes S-S (MÜNTZ, 1996).

Albuminas 2S também variam em estrutura e processamento. No geral, são sintetizadas em cadeia única e fazem quatro pontes S-S intramoleculares (TAN-WILSON; WILSON, 2012), podendo ser processadas, ou não, em duas cadeias por clivagens em sítios flanqueados por Asn (MÜNTZ, 1996). No entanto, os precursores da albumina 2S em *Arabidopsis* são clivados *in vitro* por uma aspartil-peptidase (D'HONDT et al., 1993).

Além da restrição estrutural das globulinas ao acesso de peptidases, a hidrólise prematura também é controlada pela subcompartmentalização e solubilidade das globulinas e das peptidases dentro dos corpos proteicos. As globulinas possuem uma superfície hidrofílica e um núcleo hidrofóbico, em função das cadeias α e β , acídicas e básicas, respectivamente (SHUTOV et al., 2003; TANDANG-SILVAS et al., 2012); e formam cristais insolúveis no centro dos corpos proteicos, enquanto que as peptidases acumulam-se ao redor dos cristais (HERMAN; LARKINS, 1999). Essas restrições cessam com a acidificação dos corpos proteicos, que ocorre apenas com a hidratação (HE et al., 2007), tanto porque as peptidases que iniciam a hidrólise das globulinas são, na maioria, ativas em pH ácido, quanto porque a superfície hidrofílica hidratada das globulinas torna-se acessível a peptidases. De fato, a hidrólise é iniciada pelas cadeias α das leguminas em triticales (*Fagopyrum esculentum*) (DUNAEVSKY; BELOZERSKY; VOSKOBOYNIKOVA, 1993), *Cucurbita SP* (HARA; MATSUBARA, 1980), *Glycine max* (QI et al., 1994) e *Oriza sativa* (YANO et al., 2001).

2.4.1.2 Hidrólise das proteínas de reserva

A hidrólise das PR na germinação é iniciada com a hidratação da semente e coordenada por diferentes peptidases que agem de modo sequencial e sobreposto, na medida em que são ativadas ou sintetizadas. A ideia de que diferentes peptidases realizam sequencialmente a hidrólise seletiva, que torna a PR vulnerável à hidrólise extensiva, foi sugerida por Shutov e Vaintraub (1987), que também estabeleceram critérios, seguidos até hoje, para restringir peptidases e suas funções aos processos específicos da hidrólise de proteínas de reserva: (1) a peptidase deve estar localizada (ou ser transportada) junto ao seu substrato nativo; (2) a peptidase deve hidrolisar seu substrato nativo *in vitro* e; (3) os

padrões temporais entre a atividade da peptidase e a degradação do substrato *in vivo* devem ser coincidentes.

Vicilinas e leguminas têm padrões semelhantes de hidrólise. De modo geral, no ambiente ácido dos corpos proteicos, endopeptidases específicas clivam inicialmente a cadeia α dos monômeros na sequência linear entre as regiões conservadas germina-símile, deixando-as intactas. Isso altera a estrutura nativa das globulinas, permitindo o acesso de outras endopeptidases, inativas contra a estrutura nativa – permitindo inclusive o acesso da processadora legumaína, que passa a funcionar como degradadora (MÜNTZ; BLATTNER; SHUTOV, 2002). Estas endopeptidases são estocadas durante a maturação da semente junto às globulinas nos corpos proteicos e entram em atividade na germinação ou são sintetizadas *de novo* a partir de mRNAs estocados e então transportadas para os corpos proteicos. Em ação conjunta sobre a estrutura proteica já alterada, as endopeptidases conseguem acessar e clivar também as cadeias β , gerando sítios para carboxipeptidases, também estocadas ou sintetizadas e com atividade em pH ácido. A partir daí, toda a estrutura fica exposta ao ataque generalizado. A ação das endo- e carboxipeptidases gera oligopeptídeos que são difundidos para o citoplasma, onde são finalmente degradados a aminoácidos por amino- e dipeptidases com atividade em pH neutro. Esse processo ocorre mais rapidamente no eixo embrionário, entre a hidratação da semente e o término da germinação; e mais tarde e intensamente nos cotilédones, quando a plântula está se desenvolvendo.

Em soja, a subunidade convicilina (cadeia α) da β -conglucina é a primeira a ser clivada. Essa hidrólise é realizada por uma endopeptidase da classe serino, família da subtilisina (LIU et al., 2001; BARNABY et al., 2004), com preferência para resíduos de glutamina e ácido glutâmico (BOYD et al., 2002), denominada protease C1 (porque catalisa a primeira etapa da degradação da conglucina). Protease C1 é detectada em um dia após a hidratação da

semente e cliva a região N-terminal acídica da convicilina, gerando dois fragmentos de ~50 kDa, observáveis em perfis eletroforéticos (WILSON et al., 1986). Essa peptidase não cliva a subunidade vicilina (cadeia β), que não possui região homóloga à N-terminal da convicilina. Tardiamente na germinação, uma segunda endopeptidase (protease C2), da classe cisteíno, papaína-símile, cliva ligações Lys-Thr e Thr-Ile (veja LISTA DE ABREVIATURAS) nas sequências lineares entre as regiões germina-símile de ambas subunidades da β -conglícinina (SEO; TAN-WILSON; WILSON, 2001), deixando as regiões intactas. O aparecimento da protease C2 é evidenciado eletroforeticamente devido ao desaparecimento dos fragmentos da cadeia α e ao aparecimento de fragmentos com ~25 kDa, da cadeia β , que são rapidamente degradados em seguida (WILSON et al., 1986).

Essas etapas de degradação da vicilina de soja (cadeia β) também foram observadas com as globulinas de feijão [*Phaseolus vulgaris*] (SENYUK et al., 1998) e de *Vicia sativa* (SCHLERETH et al., 2000). Em feijão, a sequência linear da faseolina é clivada na ligação Asn-Thr por uma legumaína (LLP) e os fragmentos gerados são degradados após o surgimento de outra cisteíno-endopeptidase (CPh1). A hidrólise extensiva da faseolina ocorre se a proteína for incubada *in vitro* com a LLP e depois com a CPh1, mas não se incubada com essas peptidases na ordem inversa (ZAKHAROV et al., 2004).

Nessa sequência, LLP é a verdadeira iniciadora da hidrólise proteica pelo modelo de Shutov e Vaintraub (1987), assim como a protease C2, que não requer prévia ação da protease C1. *In vitro*, a protease C2 cliva tanto as sequências lineares, quanto os N-terminais de ambas cadeias (SEO et al., 2001).

A síntese de peptidases somente após a germinação garante que as PR não serão degradadas prematuramente. LLP (MÜNTZ et al., 2001) e protease C2 (SEO; TAN-WILSON; WILSON, 2001) surgem tardiamente na germinação. No entanto, a protease C1 é estocada nos corpos proteicos (HE et al., 2007), bem

como várias CPs, papaína-símile e legumaína-símile de *Vicia sativa* (FISCHER et al., 2000). Essas peptidases são ativadas com a hidratação da semente e rapidamente fornecem aminoácidos para a síntese proteica no eixo embrionário durante a fase germinativa (SCHLERETH et al., 2000; TIEDEMANN; NEUBOHN; MÜNTZ, 2000).

Nas plantas em que se estuda mais intensamente o mecanismo de hidrólise das globulinas, as principais peptidases envolvidas são cisteíno-endopeptidases e serino-carboxipeptidases com atividade em pH ácido. No entanto, metalo-endopeptidases neutras (DUNAEVSKY; BELOZERSKY; VOSKOBOYNIKOVA, 1993) e aspartil-endopeptidases ácidas (MUTLU; GAL, 1999) também iniciam a hidrólise de leguminas em legumes e cereais.

Esses exemplos mostram que, nas plantas, estruturas proteicas semelhantes podem ser clivadas por peptidases de diferentes classes catalíticas. Isso condiz à constatação de Tan-Wilson e Wilson (2012) de que as rotas de hidrólise das PR entre diferentes plantas mostram mais similaridades em relação aos sítios de clivagem do que em relação às peptidases que os clivam. Diante das implicações evolutivas que isso remete, os autores ponderam que deve haver cautela nas generalizações sobre o mecanismo proteolítico das PR feitas a partir de modelos formulados com base em poucas espécies longamente cultivadas e que, portanto, os estudos deveriam ser expandidos para espécies selvagens. Semelhante ponderação foi feita por Bewley e Black (1994) em relação à compreensão dos mecanismos regulatórios da germinação, considerados, pelos autores, um reflexo da diversidade biológica.

3 METODOLOGIA

3.1 Material vegetal

Sementes de *A. colubrina* foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, a partir de um lote de sementes coletadas aleatoriamente de várias árvores da região, embaladas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria a 5 °C sob umidade relativa de 80 %. Os ensaios de atividade proteolítica foram realizados no Laboratório do Departamento de Biofísica do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Durante os ensaios, as sementes foram armazenadas em sacos plásticos a 4 °C.

3.1.1 Germinação e coleta de tecidos das sementes

Sementes visivelmente normais e sem danos foram colocadas para germinar em rolos com 3 folhas de papel *germitest* embebidos com água destilada num volume 2,5 vezes maior que o peso do papel. Estes rolos com sementes foram mantidos em estufa, sem controle de fotoperíodo, a 30 °C, dentro de sacos plásticos para evitar evaporação, durante 0, 6, 12, 18 e 24 h. Foram usadas 50 sementes para cada tempo de hidratação, sendo eliminadas das coletas aquelas aparentemente mortas ou apresentando necroses. Das sementes restantes, os tegumentos foram descartados e os eixos embrionários (E) e cotilédones (C) foram separados para imediata extração de proteínas.

3.1.2 Extração de proteínas

O conteúdo total de E e C coletados em cada tempo de hidratação foi macerado usando cadinho e pistilo, com auxílio de nitrogênio líquido. O material foi transferido para tubos *Falcon* de 50 mL e homogeneizado com tampão Tris-HCl [50 mM / pH 7,5] gelado na proporção de 25 mg de E ou 100 mg de C para 1 mL de tampão. O homogenato foi mantido a 4 °C durante 2 h sob agitação ocasional e depois centrifugado a 16.000 x *g* durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante (extrato bruto de proteínas hidrossolúveis) foi diluído 1:1 com glicerol (v/v) e estocado a -40 °C.

3.1.3 Quantificação proteica

A concentração proteica dos extratos foi estimada pelo método de Bradford (1976). Alíquotas de 5 µL foram quantificadas em triplicata e amostras para as análises foram obtidas mediante diluição dos extratos para a concentração final de 200 ng/µL com tampão Tris-HCl [50 mM / pH 7,5 + 50 % (v/v) de glicerol]. Após diluição, as amostras também foram quantificadas em triplicata de 5 µL. Garantida a uniformidade em relação à concentração proteica, as amostras foram fracionadas em alíquotas de 1 mL em microtubos, catalogadas de acordo com o tecido e tempo de hidratação das sementes (E0, E6, E12, E18, E24 / C0, C6, C12, C18, C24) e armazenadas a -40 °C.

3.2 Detecção da atividade proteolítica

A atividade proteolítica (*At*) nas 10 amostras de E e C foi detectada por espectrofluorometria mediante o uso de substratos peptídicos sintéticos que emitem fluorescência quando hidrolisados por peptidases. As reações de

hidrólise foram realizadas usando os substratos Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, Abz-FRAK(Dnp)-OH, F-MCA e Z-FR-MCA (veja LISTA DE ABREVIATURAS) em 7 pontos de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Cada uma das 280 reações (10 amostras x 7 pontos de pH x 4 substratos) ocorreu com 4 µg de proteínas e 5 µM de substrato, em volume completado para 1 mL com tampão 50 mM de acetato de sódio (pH 3, 4 e 5), bis-Tris (pH 6) ou Tris-HCl (pH 7, 8 e 9).

As configurações do espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F-2.500, com controle de temperatura e sistema de agitação magnética na cela da cubeta) foram ajustadas para as seguintes constantes K: K1 = 7.500 para Abz-AIAFFSRQ-EDDnp [sensibilidade de 7.500 UAF/µM ao grupo fluorescente Abz sob tensão de 700 V, fenda de excitação de 5 nm ($f_{ex}=5$), fenda de emissão de 5 nm ($f_{em}=5$) e 0,4 s de resposta]; K2 = 15.678 para Abz-FRAK(Dnp)-OH [15.678 UAF/µM, 700 V, $f_{ex}=10$, $f_{em}=20$ e 0,4 s]; e K3 = 253.350 para F-MCA e Z-FR-MCA [253.350 UAF/µM ao MCA, 700 V, $f_{ex}=10$, $f_{em}=20$ e 0,4 s]. Os comprimentos de onda utilizados foram: $\lambda_{ex} = 320$ nm / $\lambda_{em} = 420$ nm para Abz e $\lambda_{ex} = 380$ nm / $\lambda_{em} = 460$ nm para MCA.

Em todas reações foram usados os mesmos estoques de tampão e de reagentes, um mesmo jogo de pipetas automáticas e uma mesma cubeta de quartzo, lavada entre cada reação com Dextran a 10% e água desionizada. Todas reações ocorreram a 37 °C sob homogeneização constante (agitação por barra magnética dentro da cubeta).

No procedimento para todas reações, o tampão e a amostra foram colocados na cubeta previamente posicionada em sua cela e a solução foi deixada sob agitação por 3 min para estabilizar termicamente. Em seguida, o substrato foi adicionado, completando para 1 mL o volume da solução e iniciando a reação de hidrólise, transcorrida e monitorada durante 10 min.

Os resultados de atividade proteolítica nas amostras proteicas foram expressos em nM de substrato hidrolisado por μg de proteína por min, calculados mediante a equação:

$$At = \frac{Vh}{Kn \cdot pt} \cdot 1000$$

Onde At é a atividade proteolítica da amostra; Vh é a velocidade de hidrólise (em UAF/min); Kn é a constante K do equipamento para cada substrato (em UAF/ μM); e pt é a quantidade de proteína da amostra (em μg).¹

3.3 Inibição da atividade proteolítica

Após a obtenção e análise dos dados de At nas reações de hidrólise com cada substrato, foram escolhidas 6 reações com Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, 3 com Abz-FRAK(Dnp)-OH, 8 com F-MCA e 3 com Z-FR-MCA – todas escolhidas em função da expressividade da At de amostras individuais e/ou de variações particulares de At no perfil temporal e/ou no perfil de pH. Estas 20 reações foram repetidas com ou sem 1 μM de Pepstatina, 5 μM de E-64, 500 μM de PMSF ou 5 mM de *orto*-fenantrolina que, respectivamente, são inibidores de peptidases das classes Aspartil, Cisteíno, Serino e Metaló.

¹ O espectrofluorímetro detecta e acumula constantemente a fluorescência emitida pelos grupos Abz ou MCA liberados pela hidrólise do substrato – aqui, o equipamento foi ajustado para registrar esses dados a cada 0,4 s durante todo o tempo de reação. Com os registros da quantidade crescente de fluorescência no tempo, o equipamento gera uma curva de regressão linear (obtidas com $R^2 > 0,99$), cujo coeficiente angular corresponde à velocidade com que o substrato está sendo hidrolisado pela amostra, dando uma medida direta da atividade proteolítica.

Com o objetivo de manter uniforme a concentração proteica de 4 µg/mL nessas repetições, para cada amostra de E e/ou C envolvida nas reações escolhidas, foram preparadas soluções na concentração de 4 µg de proteínas por 0,9 mL de tampão, cada uma no pH da respectiva reação escolhida e no volume suficiente para realizar todas as repetições de reações de controle e de testes com cada inibidor e substrato. Todas as soluções foram mantidas no gelo até o uso.

As reações de inibição da hidrólise dos substratos com os inibidores de peptidases foram quantificadas por espectrofluorometria (item 3.3.1), exceto a reação de inibição da hidrólise do substrato Abz-FRAK(Dnp)-OH por *orto*-fenantrolina, que foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (item 3.3.2).

Com os dados de inibição obtidos (itens 3.3.1 e 3.3.2), foram indicadas as classes de peptidases envolvidas nas *At* escolhidas.

3.3.1 Inibição quantificada por espectrofluorometria

Na quantificação espectrofluorométrica da inibição da hidrólise dos substratos Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, F-MCA e Z-FR-MCA, 0,9 mL das soluções de proteína, previamente preparadas do modo e nas concentrações descritas nos itens 3.2 e 3.3, foram incubados com ou sem inibidores, dentro do espectrofluorímetro, durante 10 min a 37 °C sob agitação. Em seguida, tampão e substrato foram adicionados, completando o volume da solução para 1 mL, ajustando a concentração proteica para 4 µg/mL e iniciando a reação de hidrólise, transcorrida e monitorada durante 10 min. Os resultados foram calculados e expressos do modo descrito no item 3.2 e os valores de *At* das reações com inibidores foram transformados em porcentagens de inibição relativas ao valor da *At* do controle sem inibidores.

3.3.2 Inibição quantificada por HPLC

Na quantificação cromatográfica da inibição da hidrólise do substrato Abz-FRAK(Dnp)-OH por *orto*-fenantrolina, reações com ou sem inibidor foram realizadas durante 7,5, 15, 30 e 60 min com o objetivo de obter uma regressão linear com os dados de quantidade de hidrolisado produzido em cada tempo.

No procedimento, 8 µg de proteínas, com ou sem 5 mM de *orto*-fenantrolina, foram incubadas a 37 °C por 10 min sob agitação constante. Em seguida, foram adicionados 30 µM de substrato, completando para 1 mL o volume das soluções e iniciando a reação de hidrólise. Uma alíquota de 240 µL foi coletada em cada tempo de reação, imediatamente acrescida com 10 µL de ácido trifluoracético (TFA) 1 M para interromper a reação e congelada a -40 °C.

Dessas alíquotas, 150 µL foram injetados para quantificação em HPLC (Shimadzu) com detectores de UV-vis SPD-10AV e de fluorescência RF-535, acoplados a uma coluna *Ultrasphere* C-18 (5 µm / 4,6 mm × 150 mm) equilibrada com solvente B (90% acetonitrila + 0,1% TFA, v/v) a 10%. As amostras aplicadas foram eluídas com solvente B a uma taxa constante de 1 mL/min, com gradiente de 10 a 80% durante 28 min e monitoradas pela absorbância a 220 nm e pela emissão de fluorescência a 420 nm após excitação a 320 nm. Como padrões cromatográficos, foram injetados 150 µL das soluções: 10 µM do substrato hidrolisado por cada amostra durante 15 horas a 37 °C; 10 µM do substrato não hidrolisado; 8 µg/mL de proteínas + 40 mM de TFA; e 8 µg/mL de proteínas + 40 mM de TFA + 5 mM de *orto*-fenantrolina.

Com os dados de quantidade dos produtos da hidrólise seriada, foram construídas curvas de regressão linear (que funcionaram como repetição técnica) e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do teste em relação ao controle sem inibidor.

3.4 Análise dos dados

A quantificação da atividade proteolítica (At), detectada nos extratos proteicos brutos dos eixos embrionários e dos cotilédones, excisados antes, durante e depois da germinação, foi obtida em função da espectrofluorimetria das reações de hidrólise sobre substratos peptídicos, realizadas sob diferentes valores de pH – ou seja, para cada substrato, os dados de At foram constituídos como elementos de um conjunto independente, de modo que não há relação entre dados de diferentes conjuntos (ou substratos).

Assim, todos os valores de At das amostras, dentro de um conjunto, foram divididos pelo valor da amostra que mostrou a At máxima (At_{max}) do conjunto (At/At_{max}) e foram relatados como valores de *Atividade relativa* (Ar).

A indicação das classes catalíticas das peptidases envolvidas nas At sobre cada substrato foi obtida em função da eficiência de diferentes inibidores de classes de peptidases na inibição dessas At – ou seja, os dados de inibição, obtidos por espectrofluorometria e por cromatografia, também foram expressos relativamente, mediante a porcentagem de inibição do teste em relação ao controle sem inibidores.

Da somatória das análises com cada substrato se obteve um mapa tecido-temporal da atividade proteolítica em sementes de *A. colubrina*.

4 RESULTADOS

O mapeamento da atividade de peptidases realizado nesse trabalho teve caráter exploratório. Os experimentos foram conduzidos com extratos proteicos brutos e substratos sintéticos; não com peptidases isoladas e proteínas de reserva purificadas, que permitiriam discernir, qualificar e quantificar a atividade de peptidases específicas. Portanto, os critérios de Shutov e Vaintraub (1987) (veja item 2.3.2.1) não foram seguidos e não foi feita distinção clara entre peptidases com função específica na hidrólise das reservas proteicas das que se relacionam a outros processos celulares, apesar das atividades terem sido detectadas na germinação. Pelo mesmo motivo, também não foi feita distinção entre possíveis isoformas: embora muitas peptidases sejam comuns ao eixo e aos cotilédones, já que o tecido cotiledonar é embrionário, há membros de isoenzimas presentes diferencialmente entre esses tecidos (FISCHER et al., 2000).

No entanto, com os dados se pode indicar classes de peptidases e discernir padrões de atividade proteolítica tecido-temporais na semente submetida à germinação.

Sendo assim, para efeito de discussão dos resultados, uma mesma classe catalítica, detectada tanto no eixo embrionário, quanto nos cotilédones, foi considerada como representada por enzimas comuns a ambos tecidos e que as diferentes atividades relativas (A_r) entre esses tecidos foram devidas a diferentes concentrações dessas enzimas em cada tecido, refletidas na concentração proteica constante dos extratos brutos das amostras.

Além disso, foi usada a protrusão da radícula como critério de germinação. Por esse critério, 4% das sementes germinaram em 12 h de hidratação, 58% em 18 h e 93% em 24h (dados não mostrados). No entanto, as atividades detectadas em 6 h foram intermediárias entre 0 e 12 h e as detectadas em 18 h foram intermediárias entre 12 e 24 h, tanto para o eixo embrionário,

quanto para os cotilédones. Desse modo, os dados de *Ar* dos tempos 6 e 18 h não foram mostrados, bastando para a análise os tempos de hidratação 0, 12 e 24 h como representativos dos eventos proteolíticos anteriores e posteriores à germinação de *A. colubrina*.

4.1 Peptidases detectadas com a hidrólise de Abz-AIAFFSRQ-EDDnp

Com a hidrólise do substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, específico para endopeptidases, as atividades máximas ocorreram em pH 3 (Gráfico 1) e foram 100% inibidas por pepstatina em todos os pontos testados (Tabela 1). A adição de 5 mM de DTT ou E-64 nos pontos de pH 5 e 7 não resultou, respectivamente, em aumento ou diminuição de atividade (Tabela 1), o que exclui a presença de cisteíno-peptidases (CALLIS, 1995). Desses resultados, indica-se que a atividade detectada foi exclusiva de aspartil-endopeptidases.

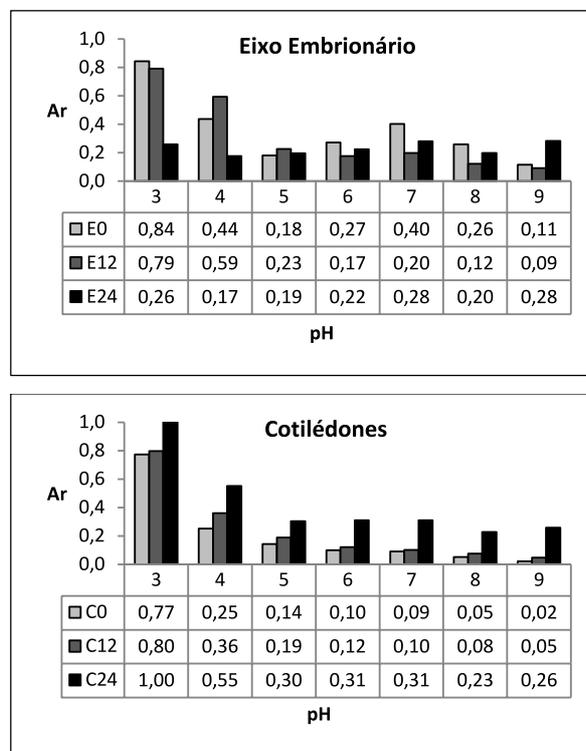


GRÁFICO 1 Atividade proteolítica detectada com Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. Atividade proteolítica relativa (*Ar*), em pH 3 a 9, quantificada por espectrofluorometria, em função da hidrólise do substrato fluorescente Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, ocorrida em extratos proteicos do eixo embrionário e dos cotilédones de *A. colubrina*, excisados em 0, 12 e 24 h após a hidratação da semente (E0, E12, E24 e C0, C12, C24, respectivamente).

TABELA 1 **Classes de peptidases identificadas com Abz-AIAFFSRQ-EDDnp.** Identificação das classes de peptidases obtida em função da inibição da atividade proteolítica (em %), sobre o substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp, exercida por diferentes inibidores de peptidases. [valores entre parênteses = pH da reação; *nulo* = atividade não inibida por E-64, nem aumentada por DTT; (-) não testado].

amostras	Pepstatina (aspartil)	E-64 (cisteíno)	PMSF (serino)	<i>o</i> -fenantrolina (metalo)
E0	100 (3)	<i>nulo</i> (5;7)	-	-
E12	100 (3;4)	-	-	-
E24	100 (3)	-	-	-
C0	100 (3)	-	-	-
C24	100 (3)	<i>nulo</i> (5;7)	-	-

Aspartil-peptidases (APs) vegetais (fitopepsinas) são endopeptidases especificamente inibidas por pepstatina (KULKARNI; RAO, 2007; MUTLU; GAL, 1999; SIMÕES; FARO, 2004). Possuem atividades máximas em pH ácido sobre vários substratos orgânicos ou sintéticos (KERVINEN et al., 1993; SARKKINEN et al., 1992; TORMAKANGAS et al., 1994; WROBEL; JONES, 1992), hidrolisando-os geralmente entre resíduos hidrofóbicos (KERVINEN et al., 1993), como é o caso dos resíduos Ala (A), Ile (I) e Phe (F) presentes em Abz-AIAFFSRQ-EDDnp.

A análise do perfil temporal *versus* perfil de pH na atividade proteolítica de sementes de *A. colubrina* sobre esse substrato sugere a presença de 3 aspartil-endopeptidases e de uma endopeptidase não caracterizada neste trabalho, expressas diferencialmente entre os tecidos (Gráfico 1): a primeira AP (AP1) é estocada em ambos tecidos da semente seca, como indicada pelas atividades de E0 e C0 em pH 3. A segunda AP (AP2) é sintetizada durante a germinação, como indicada pela maior atividade de E12 ou C12 sobre E0 ou C0 em pH 4. O perfil de atividade em pH 4 também indica que AP1 e AP2 estão em maior quantidade no eixo embrionário e que, comparado ao perfil em pH 3, AP2 se distingue de AP1 por ser mais ativa em pH 4, embora ambas tenham atividade

máxima em pH 3. A terceira AP (AP3) é sintetizada após a germinação, como indicada pela At_{max} em C24/pH3, bem como pela atividade baixa, porém estável, em todos os outros pontos de pH em E24 e C24. APs estáveis entre pH 2 e 10 são relatadas em *Arabidopsis* (MAZORRA-MANZANO et al., 2010) e *V. radiata* (KULKARNI; RAO, 2007), porém, com preferências para hidrolisar ligações Leu-Tyr e Phe-Tyr, respectivamente. E a quarta endopeptidase, cuja classe não foi determinada neste trabalho, é estocada principalmente no eixo embrionário, como indicada pela atividade em E0/pH7.

Destes dados se sugere uma sequência na qual AP1 inicia a proteólise nos corpos proteicos, em ambos tecidos, é seguida pela tradução de mRNAs para AP2, principalmente no eixo embrionário; e depois pela transcrição e tradução de mRNAs para AP3, principalmente nos cotilédones.

A indicação dessas 3 APs em *A. colubrina* está de acordo com o padrão geral de sementes estocarem formas inativas de peptidases e de seus respectivos mRNAs durante a maturação – ambos entrando em atividade durante a embebição, bem como transcreverem novos mRNAs após a germinação, sugerindo que peptidases e mRNAs estocados nos embriões são suficientes para a germinação e que a maior massa das reservas proteicas são mobilizadas dos órgãos de armazenagem em eventos pós-germinativos (BEWLEY, 1997; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010).

De fato, APs são acumuladas em corpos proteicos, processam precursores de proteínas de reserva (PR) (HIRAIWA et al., 1997) e hidrolisam PR *in vitro* (SIMÕES; FARO, 2004; TAMURA et al., 2007), o que mostra participarem das fases iniciais da germinação de acordo com os critérios de Shutov e Vaintraub (1987).

Além disso, dois ou mais cDNAs para diferentes APs foram obtidos de sementes sob maturação e sob germinação em trigo sarraceno (MILISAVLJEVIC et al., 2008), trigo (TAMURA et al., 2007), soja

(TERAUCHI et al., 2006) e *Arabidopsis* (CHEN; PFEIL; GAL, 2002), bem como foram observadas, em sistema eletroforético de atividade enzimática, 4 bandas de atividade aspartil provenientes de sementes de cevada sob germinação (WROBEL; JONES, 1992).

4.2 Peptidases detectadas com a hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH

Com a hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH, específico para detectar carboxipeptidases, nota-se que a atividade no eixo embrionário foi maior do que nos cotilédones, mas que, em ambos, aumentou com o tempo (Gráfico 2). Isso sugere a presença de peptidases tanto estocadas, quanto sintetizadas durante e após a germinação. Essas peptidases, indicadas em função da efetividade dos inibidores de peptidases (Tabelas 2 e 2A), são das classes aspartil, cisteíno e metalo no eixo e das classes cisteíno e metalo nos cotilédones.

A indicação das classes cisteíno (CPs) e aspartil (APs) foi baseada na quantificação espectrofluorométrica relativa de Abz liberado durante a hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH ocorrida em amostras pré-incubadas com e sem E-64 ou pepstatina (Tabela 2), enquanto que a indicação das metalo-peptidases (MPs) foi baseada na quantificação cromatográfica relativa de três fragmentos desse substrato hidrolisado por amostras pré-incubadas com e sem *orto*-fenantrolina (Tabela 2A). Estes fragmentos apresentaram-se em picos com diferentes tempos de retenção (T_r) durante a hidrólise quase total do substrato: um pico proeminente ($T_r = 11,8$ min) presente nas 3 amostras; um segundo pico igualmente proeminente ($T_r = 12,3$ min) em E24/pH4, que é bastante reduzido em C24/pH4 e insignificante em E24/pH7; e um terceiro pico pouco expressivo ($T_r = 12,7$ min), presente apenas em E24/pH7 (Figura 2).

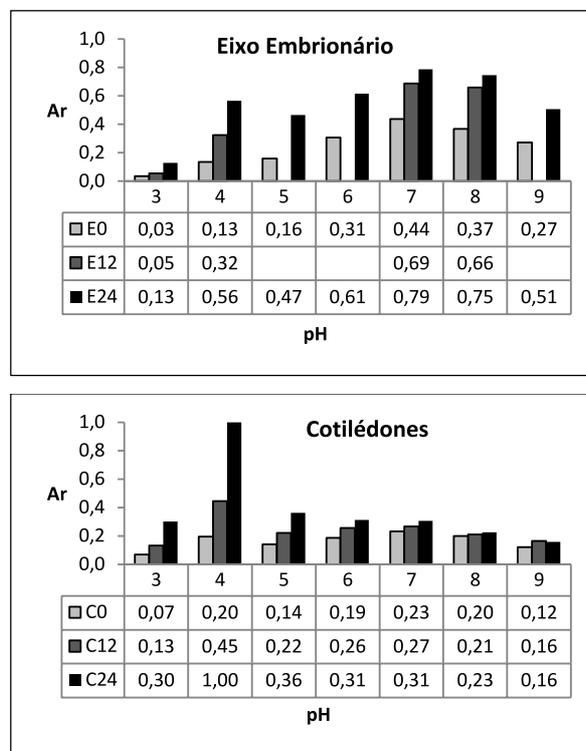


GRÁFICO 2 Atividade proteolítica detectada com Abz-FRAK(Dnp)-OH. Atividade proteolítica relativa (*Ar*), em pH 3 a 9, quantificada por espectrofluorometria, em função da hidrólise do substrato fluorescente Abz-FRAK(Dnp)-OH, ocorrida em extratos proteicos do eixo embrionário e dos cotilédones de *A. colubrina*, excisados em 0, 12 e 24 h após a hidratação da semente (E0, E12, E24 e C0, C12, C24, respectivamente).

TABELA 2 Classes de peptidases identificadas com Abz-FRAK(Dnp)-OH. Identificação das classes de peptidases obtida em função da inibição da atividade proteolítica (em %), sobre o substrato Abz-FRAK(Dnp)-OH, exercida por diferentes inibidores de peptidases. [valores entre parênteses = pH da reação; HPLC = inibição quantificada por HPLC (Tabela 2A); *nr* = valores não representativos].

amostras	Pepstatina (aspartil)	E-64 (cisteíno)	PMSF (serino)	<i>o</i> -fenantrolina (metalo)
E24	36 (4)	57 (4); 3 ^{nr} (7)	1 ^{nr} (7)	HPLC (4;7)
C24	14 ^{nr} (4)	87 (4)		HPLC (4)

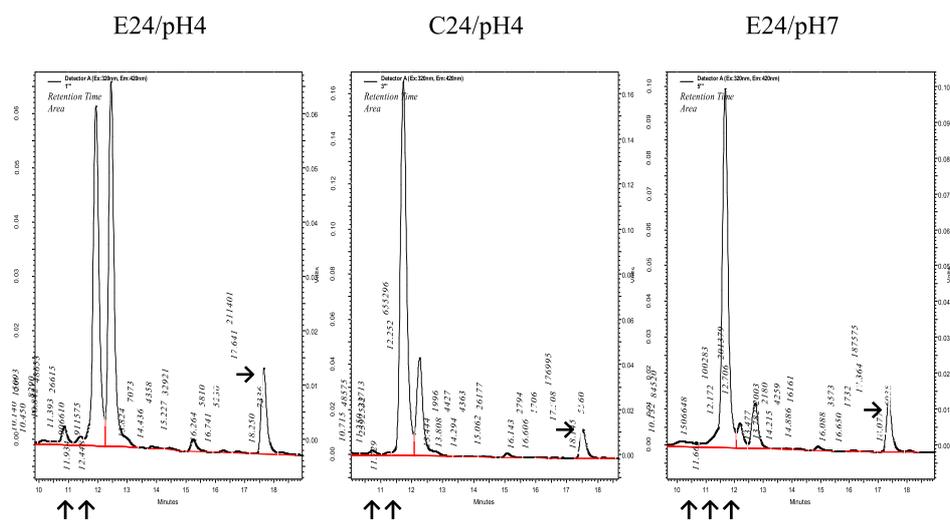


FIGURA 2 Fragmentos da hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH detectados por HPLC. Abz-FRAK(Dnp)-OH hidrolisado quase totalmente pelas amostras E24/pH4, C24/pH4 e E24/pH7 gerou 3 fragmentos com picos em diferentes tempos de retenção ($T_r = 11,8; 12,3$ e $12,7$ min, aproximadamente), indicados pelas setas verticais abaixo dos gráficos. Valores sobre os picos = T_r e área do pico, respectivamente. Seta horizontal indica pico do substrato não hidrolisado.

TABELA 2A Inibição da hidrólise de Abz-FRAK(Dnp)-OH quantificada por HPLC. Abz-FRAK(Dnp)-OH hidrolisado pelas amostras E24/pH4, C24/pH4 e E24/pH7 gerou 3 fragmentos com picos em diferentes tempos de retenção [*Tr* 11,8; 12,3 e 12,7 (Figura 2)]. Estes fragmentos foram obtidos em quantidades proporcionais aos tempos de hidrólise seriada (7,5; 15,0; 30,0; 60,0 min) com ou sem *orto*-fenantrolina [respectivamente, inibido (*i*) e controle (*c*)]. Curvas de regressão linear foram construídas com os valores de área dos picos dessas quantidades [coeficiente angular (*CA*) e R^2 indicados]. A razão entre as quantidades relativas (*Qr*) da soma dos fragmentos *i* e *c* por amostra foi usada para determinar a porcentagem de inibição da hidrólise do substrato.

		E24/pH4		C24/pH4		E24/pH7	
		<i>i</i>	<i>c</i>	<i>i</i>	<i>c</i>	<i>i</i>	<i>c</i>
Tr 11,8	7,5	100188	274256	568197	964183	166120	407029
	15,0	126810	326520	951756	1467040	325765	556018
	30,0	239538	528838	1075611	1969896	530966	852088
	60,0	387110	905879	1136122	2389160	993327	1485255
	<i>CA</i>	5601	12320	8669	25171	15432	20559
	R^2	0,991	0,996	0,623	0,896	0,997	0,999
Tr 12,3	7,5	223359	256982	201983	272680	39393	62147
	15,0	316272	325827	423603	388173	0	63848
	30,0	536795	519355	451907	503666	0	76122
	60,0	925441	911347	644766	659826	0	99579
	<i>CA</i>	13447	12643	7218	6961		740
	R^2	0,999	0,998	0,854	0,955		0,990
Tr 12,7	7,5					0	51812
	15,0					0	68870
	30,0					0	114616
	60,0					0	200842
	<i>CA</i>						2872
	R^2						0,999
<i>Qr</i>	0,33	0,47	0,63	1,00	0,24	0,47	
inibição	29 %		37 %		49 %		

Com os dados de inibição sobre Abz-FRAK(Dnp)-OH, obteve-se a indicação de atividade carboxipeptidásica de APs, CPs e MPs em pH ácido e neutro (Tabelas 2 e 2A).

Em relação às CPs ácidas, é possível que a enzima detectada seja alguma catepsina vegetal. Catepsinas são, geralmente, endo-CPs da família da papaína. Porém, catepsina-B humana e catepsinas-L de *Trypanosoma* e de *Leishmania*, que são endo-CPs dessa família, possuem atividade carboxipeptidásica em pH ácido sobre Abz-FRAK(Dnp)-OH (CEZARI et al., 2002; JUDICE et al., 2004) e genes homólogos da catepsina-B humana foram descritos em trigo (*T. aestivum*), cevada (*H. vulgare*) e tabaco (*N. rustica*). Em trigo (CEJUDO et al., 1992) e cevada (MARTINEZ, 2003), catepsina-B vegetal é regulada por ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA₃) nas camadas de aleurona e sua expressão aumenta com a germinação. Em tabaco, se relaciona ao desenvolvimento de raízes, caule e flores (LIDGETT et al., 1995).

Várias catepsinas vegetais foram descobertas. HvPap-1, uma catepsina-F de cevada da classe cisteíno, foi caracterizada (CAMBRA et al., 2012). HvPap-1 purificada de *E. coli* recombinada degrada *in vitro* substratos sintéticos e as nativas hordeínas, albuminas e globulinas. A enzima é imunodetectada nos corpos proteicos (ambiente ácido) e o gene é expresso nas camadas isoladas de aleurona sob tratamento de GA₃. Esses dados suportam a participação direta da HvPap-1 na hidrólise das proteínas de reserva durante a germinação.

Como houve a indicação de que a atividade carboxipeptidásica detectada em E/24 e C/24, pH 4 (Gráfico 2), foi devida a CPs (Tabela 2), parece possível que alguma catepsina vegetal participe da germinação em *A. colubrina*.

Porém, atividade carboxipeptidásica da classe aspartil e atividade metalo-peptidásica em pH ácido, detectadas com a inibição desse substrato (Tabelas 2 e 2A), são dados conflitantes.

Segundo busca no banco de dados MEROPS (RAWLINGS et al., 2014), nenhuma carboxipeptidase é da classe aspartil. Todas APs conhecidas são endopeptidases restritas. No entanto, catepsinas D e E são endo-APs da família A1 (pepsina, fitopepsina) – ativas em pH ácido e inibidas por pepstatina (MAYNADIER et al., 2013; SARKKINEN et al., 1992). Catepsina D-símile foi caracterizada em cevada (RUNEBERG-ROOS; TÖRMÄKANGAS; ÖSTMAN, 1991; SARKKINEN et al., 1992) e, de três genes descritos para catepsina D-símile em *Arabidopsis* (BEERS; JONES; DICKERMAN, 2004), um é expresso apenas em sementes (CHEN; PFEIL; GAL, 2002; MUTLU et al., 1999).

APs da família da pepsina, bem como CPs da família da papaína, clivam uma grande variedade de substratos e Abz-FRAK(Dnp)-OH foi usado para caracterizar atividade carboxipeptidásica em pH ácido de catepsinas B e L da família da papaína (CEZARI et al., 2002; JUDICE et al., 2004). Assim, parece possível que esse substrato seja clivado também por alguma catepsina vegetal da família da pepsina (D ou E). No entanto, com base em mais de 800 ensaios depositados no banco MEROPS (RAWLINGS et al., 2014), parece que catepsina D humana tem pouca preferência para hidrolisar Abz-FRAK(Dnp)-OH, muito embora esse substrato não conste nestes ensaios.

Portanto, em função das informações disponíveis e dos limites de nossos dados, não é razoável supor a presença de uma carboxi-AP em *A. colubrina* sem estudos específicos sobre a atividade e inibição detectadas.

A mesma busca no banco MEROPS (RAWLINGS et al., 2014) também revelou que MPs vegetais são, de modo geral, endo- ou aminopeptidases. Nenhuma carboxi-MP foi descrita em plantas. Todavia, sequências gênicas relativas à família M14, que contém carboxi-MPs, foram depositadas para muitas espécies vegetais. Porém, MPs são enzimas caracteristicamente neutras. É descrita apenas uma MP de *Leishmania* (família M18) que possui atividade

máxima em pH ácido (McGWIRE; CHANG, 1996 apud BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004).

Sendo assim, é condizente que *orto*-fenantrolina tenha inibido a atividade de uma possível carboxi-MP vegetal em E24/pH7, mas não é condizente a mesma ocorrência em E24/pH4 e C24/pH4 (Tabela 2A).

Abz-FRAK(Dnp)-OH foi usado para caracterizar atividade carboxipeptidásica de CPs (CEZARI et al., 2002; JUDICE et al., 2004) e carboxi-MPs possuem afinidade a este substrato (Prof. Dr. Luís Juliano, UNIFESP, comunicação pessoal). Assim, parece possível que esse substrato seja clivado por carboxi-CPs (em pH ácido) e carboxi-MPs (em pH neutro).

De fato, o perfil de clivagem foi mais semelhante entre tecidos, num mesmo pH, do que entre pHs, num mesmo tecido (Figura 2, onde se vê que os fragmentos Tr11,8 e Tr12,3 são liberados por E24 e C24, em pH 4, enquanto que os fragmentos Tr11,8 e Tr12,7 são liberados por E24, apenas em pH 7). Condizentemente, E-64 inibiu a atividade em E24/pH4 (mais ainda C24/pH4), mas não inibiu em E24/pH7 (Tabela 2), enquanto que *orto*-fenantrolina inibiu a atividade em E24 mais expressivamente em pH 7 do que em pH 4 (Tabela 2A).

Pelo conjunto de dados com Abz-FRAK(Dnp)-OH, parece mais plausível supor que, em pH ácido, *orto*-fenantrolina inibiu de modo inespecífico a atividade de alguma carboxi-CP (possivelmente uma catepsina) e que, em pH neutro, de modo específico inibiu alguma carboxi-MP.

4.3 Peptidases detectadas com a hidrólise de F-MCA

Com a hidrólise de F-MCA, usado geralmente para detectar aminopeptidases, as maiores atividades ocorreram em pH 7 (Gráfico 3) e foram devidas a serino-peptidases (SPs) e MPs, respectivamente indicadas em função da inibição por PMSF e *orto*-fenantrolina (Tabela 3).

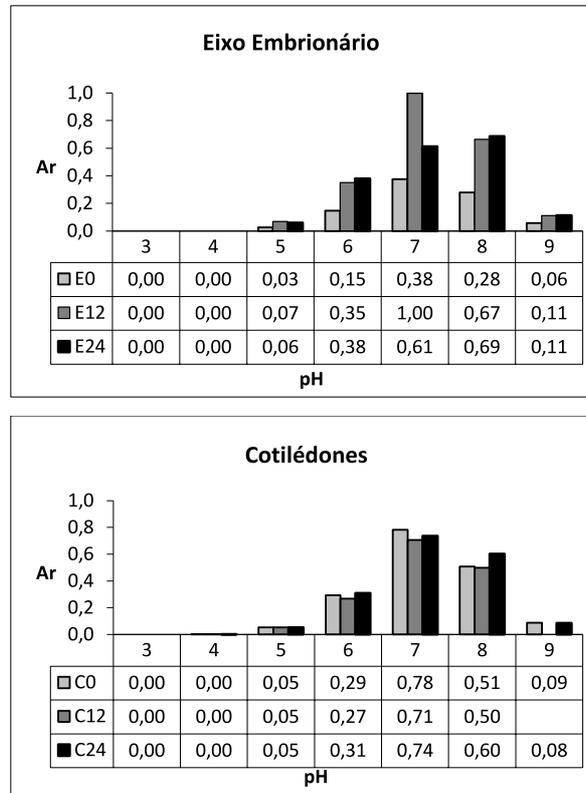


GRÁFICO 3 Atividade proteolítica detectada com F-MCA. Atividade proteolítica relativa (*Ar*), em pH 3 a 9, quantificada por espectrofluorometria, em função da hidrólise do substrato fluorescente F-MCA, ocorrida em extratos proteicos do eixo embrionário e dos cotilédones de *A. colubrina*, excisados em 0, 12 e 24 h após a hidratação da semente (E0, E12, E24 e C0, C12, C24, respectivamente).

TABELA 3 **Classes de peptidases identificadas com F-MCA.** Identificação das classes de peptidases obtida em função da inibição da atividade proteolítica (em %), sobre o substrato F-MCA, exercida por diferentes inibidores de peptidases. [valores entre parênteses = pH da reação; (-) não testado; *nr* = valores não representativos].

amostras	Pepstatina (aspartil)	E-64 (cisteíno)	PMSF (serino)	<i>o</i> -fenantrolina (metalo)
E0	-	-	38 (7)	76 (7)
E12	-	-	35 (7)	77 (7)
E24	-	19 ^{nr} (7); 5 ^{nr} (8)	47 (7); 13 ^{nr} (8)	74 (7); 73 (8)
C0	-	-	32 (7)	77 (7)
C12	-	-	32 (7)	80 (7)
C24	-	0 (7); 13 ^{nr} (8)	39 (7); 14 ^{nr} (8)	77 (7); 75 (8)

No perfil de atividade temporal, nota-se que, no eixo embrionário, houve aumento de atividade durante a germinação, seguida de queda após a germinação, enquanto que, nos cotilédones, a atividade foi constante. Isso sugere que, no eixo, enzimas estocadas foram ativadas, depois sintetizadas *de novo* e, com esgotamento das reservas, degradadas. Nos cotilédones, a uniformidade da atividade não mostra se enzimas estocadas foram sintetizadas durante e após a germinação, embora isso seja provável.

Metalo-aminopeptidases (amino-MPs) vegetais estão distribuídas nas famílias M1, M17 e M24. Essa distribuição é baseada principalmente no sequenciamento do genoma de *Arabidopsis* (RAWLINGS et al., 2014). Dentre as amino-MPs dessas famílias, aquelas que parecem as mais prováveis para hidrolisar F-MCA em pH neutro são: leucil aminopeptidase vegetal, família M17, que se relaciona a respostas contra ferimentos e patógenos, detectada em cevada (OSZYWA; MAKOWSKI; PAWELCZAK, 2013); e alanil aminopeptidase citoplasmática, família M1, que se relaciona à prófase meiótica (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004). Em *Arabidopsis*, esta última, denominada APM1, hidrolisa um inibidor do transporte de auxina. Mutações

com perda de função de APM1 resultam em divisões celulares descoordenadas durante a embriogênese e letalidade após a germinação (PEER et al., 2009).

Estudos com serino-aminopeptidases (amino-SPs) em plantas são mais raros ainda. O único trabalho encontrado relata a purificação de uma tripeptidil-peptidase II (TPPII), de *Arabidopsis*, que hidrolisa AAF-MCA em pH 7 e é inibida por PMSF (BOOK et al., 2005). TPPII é uma exopeptidase citoplasmática intermediária na reciclagem de aminoácidos centralizada no complexo proteolítico do proteassoma; por isso, considerada constitutiva (PRETA et al., 2010). Não se sabe se TPPII atua na fase citoplasmática da degradação das PR, pois não se atribui função na germinação ao proteassoma, apesar dos níveis das formas 20S e 26S variarem em sementes de espinafre (*Spinacia oleracea*) durante a germinação (MIYAWAKI et al., 1997).

4.4 Peptidases detectadas com a hidrólise de Z-FR-MCA

Com a hidrólise do substrato Z-FR-MCA, geralmente hidrolisado por CPs e SPs, a atividade foi mais expressiva no eixo embrionário e crescente tanto com o tempo, quanto com a escala de pH (Gráfico 4). A adição de 5 mM de DTT às reações não alterou a baixa atividade nos cotilédones (dados não mostrados). A atividade no eixo foi inibida por *orto*-fenantrolina em E0 e E12, indicando atividade de MPs, enquanto que, em E24, foi inibida por *orto*-fenantrolina, E-64 e PMSF, indicando atividade de MPs, CPs e SPs, respectivamente (Tabela 4).

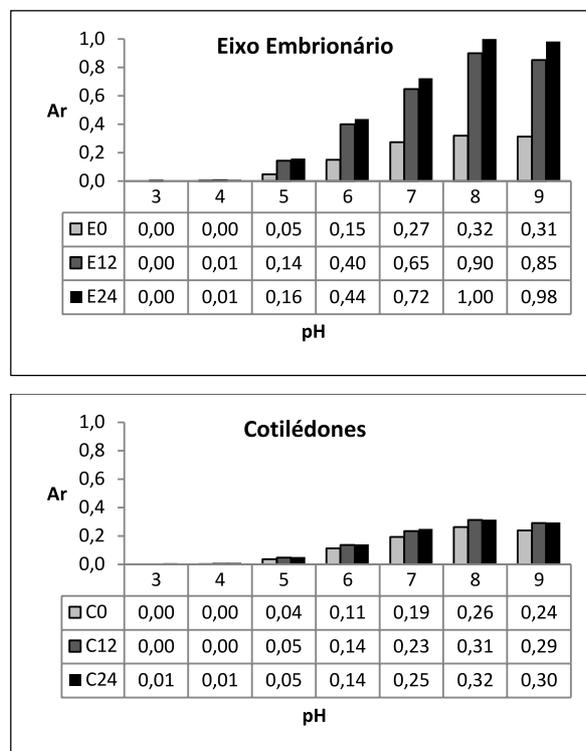


GRÁFICO 4 Atividade proteolítica detectada com Z-FR-MCA. Atividade proteolítica relativa (Ar), em pH 3 a 9, quantificada por espectrofluorometria, em função da hidrólise do substrato fluorescente Z-FR-MCA, ocorrida em extratos proteicos do eixo embrionário e dos cotilédones de *A. colubrina*, excisados em 0, 12 e 24 h após a hidratação da semente (E0, E12, E24 e C0, C12, C24, respectivamente).

TABELA 4 Classes de peptidases identificadas com Z-FR-MCA. Identificação das classes de peptidases obtida em função da inibição da atividade proteolítica (em %), sobre o substrato Z-FR-MCA, exercida por diferentes inibidores de peptidases. [valores entre parênteses = pH da reação; (-) não testado; *nr* = valores não representativos].

amostras	Pepstatina (aspartil)	E-64 (cisteíno)	PMSF (serino)	<i>o</i> -fenantrolina (metalo)
E0	-	23 ^{nr} (8)	8 ^{nr} (8)	52 (8)
E12	-	21 ^{nr} (8)	14 ^{nr} (8)	56 (8)
E24	-	52 (8)	56 (8)	52 (8)

As legumainas são um grupo de endo-CPs relacionadas ao mecanismo de estocagem e de hidrólise de globulinas de reserva em algumas plantas-modelo (MÜNTZ et al., 2001; MÜNTZ; BLATTNER; SHUTOV, 2002; MÜNTZ; SHUTOV, 2002; SCHALLER, 2004; SCHLERETH et al., 2000; SHUTOV; VAINTRAUB, 1987). Uma das maiores evidências da participação destas CPs nesses mecanismos reside no fato de serem estocadas junto às globulinas no ambiente ácido dos corpos proteicos. De fato, a atividade máxima dessas CPs purificadas é em pH ácido (SCHLERETH et al., 2000; QI et al., 1994), inclusive sobre Z-FR-MCA (SUTOH; KATO; MINAMIKAWA, 1999).

Portanto, é mais provável que a atividade cisteíno detectada com Z-FR-MCA no eixo embrionário de *A. colubrina* seja relacionada a outro processo celular, já que a atividade máxima ocorreu em pH neutro-alcálico (Gráfico 4). A única peptidase encontrada para essa condição foi a citoplasmática fitocalpaína, codificada pelo gene DEK-1 (*Defective Kernel*) de milho e seus ortólogos em 11 espécies. Esta CP, Ca⁺-dependente e associada à polarização celular, é enzima-chave na proliferação e diferenciação celular durante a organogênese vegetal, incluindo a dos primórdios foliares (AHN et al., 2004; HIBARA et al., 2009; JOHNSON et al., 2008; LID et al., 2005). Condizente à função da fitocalpaína, o padrão temporal na atividade de CPs neutro-alcálicas de *A. colubrina* no eixo embrionário, bem como a possível presença em menor concentração dessas enzimas nos cotilédones, sugere um processo de desenvolvimento da plântula.

Devido às baixas atividades proteolíticas nos cotilédones (Gráfico 4), as atividades cisteíno, serino e metalo não foram testadas (Tabela 4). No entanto, supõem-se que as baixas atividades detectadas nos cotilédones sejam devidas a menores concentrações das mesmas peptidases detectadas em alta concentração após a germinação no eixo embrionário – o que torna estranho que a atividade de CPs, bem como de SPs e MPs, neutro-alcálicas, seja baixa nos cotilédones de *A. colubrina*. Apesar de CPs como a LLP de feijão (MÜNTZ et al., 2001) e a

protease C2 de soja (SEO et al., 2001) serem detectadas em torno de 5 dias após a hidratação, também há SPs, como a protease C1 de soja (HE et al., 2007) e várias CPs de *Vicia sativa* (FISCHER et al., 2000) que são estocadas nos corpos proteicos do eixo embrionário e dos cotilédones e ativadas com a hidratação.

Amino-MPs neutro-alcalinas com preferência para Phe ou Leu estão associadas à hidrólise final das globulinas. Endo- e carboxipeptidases ácidas liberam oligopeptídios que são difundidos dos corpos proteicos para o citoplasma, onde são finalmente clivados por SPs e MPs neutro-alcalinas (SHUTOV; VAINTRAUB, 1987). Considerando que essa fase final deve ser intensa nos tecidos de armazenagem proteica, é possível que atividade metalo aumentasse após 24 h nos cotilédones de *A. colubrina*.

Outra possibilidade para explicar esse perfil tecido-temporal de MPs neutro-alcalinas em *A. colubrina* reside nas matrixinas vegetais, que são endo-MPs citoplasmáticas associadas ao remodelamento da membrana celular em processos de desenvolvimento e/ou fermento (DELORME et al., 2000; MAIDMENT et al., 1999; McGEEHAN et al., 1992). O padrão temporal constante da atividade metalo com Z-FR-MCA no eixo embrionário (Tabela 4) sugere mais uma atividade proteolítica associada ao remodelamento constante de membranas em tecidos se desenvolvendo do que uma atividade associada à hidrólise proteica, que se espera crescente com a germinação, principalmente nos cotilédones. No entanto, parece que matrixinas não têm preferência por Phe ou Arg (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004).

Das SPs em plantas, uma suposição razoável é a pouco conhecida tripsina-símile oligopeptidase-B vegetal (clã SC, família S9, classificação MEROPS), homóloga da oligopeptidase-B de *E. coli*.

Oligopeptidase-B vegetal é expressa em embriões quiescentes e germinantes de trigo e clivou Z-FR-MCA com atividade máxima em pH 8,5 (TSUJI; YUASA; MATSUDA, 2004; TSUJI et al., 2004). Não se sabe seu papel

em plantas, nem qual seu substrato nativo, mas, devido às suas especificidades de clivagem e ineficiência contra alguns substratos proteicos, os autores discutem seu papel mais em função do *turn-over* de proteínas citoplasmáticas do que em função da hidrólise de reservas proteicas. Resultado semelhante foi obtido com *Canavalia ensiformis*. Uma SP alcalina purificada de sementes mostrou alta preferência por Arg (Z-RR-MCA) em pH 8 e pouca eficiência contra a nativa concavalina (DEMARTINI; WLODAWER; CARLINI, 2007).

Embora as etapas finais da degradação das PR ocorram no citoplasma por peptidases neutras, que não reconhecem a proteína nativa não-modificada, presente no ambiente ácido dos corpos proteicos (SHUTOV; VAINTRAUB, 1987), a hipótese da oligopeptidase-B vegetal não participar da hidrólise proteica (TSUJI; YUASA; MATSUDA, 2004) condiz à baixa atividade proteolítica nos cotilédones de *A. colubrina* sobre Z-FR-MCA (Gráfico 4), considerando que a SP detectada no eixo embrionário esteja presente também nos cotilédones, embora em baixas concentrações.

5 DISCUSSÃO

Usando peptídios fluorescentes e inibidores de peptidases, detectamos várias atividades proteolíticas associadas às classes das APs, CPs, MPs e SPs em extratos proteicos brutos provenientes do eixo embrionário e dos cotilédones excisados de sementes de *A. colubrina* antes, durante e depois da germinação. Estas condições experimentais não permitem relacionar diretamente essas atividades com os eventos germinativos, pois não permitem discernir peptidases específicas, seus substratos nativos, nem suas funções. No entanto, com os dados gerados foi possível fazer inferências sobre a possível identidade das peptidases relacionadas às atividades detectadas. Inferências feitas a partir da determinação da classe catalítica (baseada no pH de atividade e nos inibidores e substratos utilizados) e do perfil de atividade proteolítica tecido-temporal na semente.

Considerando isso, houve a indicação de que fitopepsinas (aspartil-peptidases) são as enzimas que iniciam a hidrólise das PR em *A. colubrina*. Em dicotiledôneas, as enzimas mais comuns nessa fase são cisteíno-peptidases. Legumainas e outras CPs estão envolvidas tanto no processamento de globulinas de reserva durante a maturação da semente, quanto na hidrólise das mesmas dentro dos corpos proteicos (MÜNTZ et al., 2001; MÜNTZ; BLATTNER; SHUTOV, 2002; MÜNTZ; SHUTOV, 2002; SCHALLER, 2004; SCHLERETH et al., 2000; SHUTOV; VAINTRAUB, 1987).

Porém, fitopepsinas também são descritas para a mesma fase (MUTLU et al., 1999). O substrato Abz-AIAFFSRQ-EDDnp foi desenhado para detectar especificamente endo-CPs (Prof. Dr. Luís Juliano, comunicação pessoal). No entanto, endo-CPs ácidas não foram detectadas. Pelo contrário, foi detectada exclusiva atividade de 3 possíveis APs. Por outro lado, legumainas são endo-CPs com especificidade restrita para clivar *in vitro* ligações com Asn (N) em P1

(JUNG et al., 1998). No entanto, usando o substrato Abz-KLNSSKQ-EDDnp, com N em P1, não foi detectada atividade em pH ácido (dados não mostrados).

Embora a não-deteção com esses substratos não exclua a possibilidade da presença de endo-CPs ácidas, fitopepsinas têm sido associadas à hidrólise proteica, de modo direto, pela presença em corpos proteicos e/ou hidrólise de substrato nativo *in vitro*, em *Arabidopsis* (MUTLU et al., 1999), cevada (RUNEBERG-ROOS et al., 1994), trigo (DUNAEVSKY; SARBAKANOVA; BELOZERSKY, 1989; TAMURA et al., 2007) e, de modo indireto, na germinação como um todo, em soja (TERAUCHI et al., 2006), trigo sarraceno (MILISAVLJEVIC et al., 2008), cardo (PEREIRA et al., 2008) e *Centaurea calcitrapa* (SALVADOR; NOVO; DOMINGOS, 2006).

Porém, Shutov e Vaintraub (1987) ponderam que o pH dos corpos proteicos é em torno de 4-5; e globulinas, em pH 3, sofrem alterações conformacionais que poderiam gerar sítios para APs, de modo que estas, apesar de possivelmente participarem da hidrólise, não desencadeariam o processo. De fato, o perfil de expressão temporal de APs no eixo embrionário de *A. colubrina* é diferente entre pH 3 e 4. No entanto, uma MP inicia a hidrólise das leguminas em triticale (*Fagopyrum esculentum*) (DUNAEVSKY; BELOZERSKY; VOSKOBOYNIKOVA, 1993), o que indica que globulinas nativas podem ser clivadas por mais de uma classe de peptidases.

De qualquer modo, o padrão temporal da atividade das endo-APs em *A. colubrina* é concordante com o fato do eixo embrionário consumir rapidamente suas reservas mediante peptidases, tanto estocadas na semente, quanto sintetizadas durante a germinação, enquanto que os cotilédones aumentam a síntese dessas enzimas principalmente após a germinação, de modo a incrementar o suprimento de aminoácidos para a plântula. Portanto, independente da fase ou da possível presença de CPs, fitopepsinas devem participar da hidrólise proteica em *A. colubrina*.

No caso da atividade carboxi-MP detectada com Abz-FRAK(Dnp)-OH, não foi possível supor alguma enzima específica, nem uma possível função, pois atividade de carboxi-MPs não são descritas em plantas, embora sequências para várias espécies estejam depositadas no banco MEROPS (RAWLINGS et al., 2014). De qualquer modo, segundo Shutov e Vaintraub (1987), as carboxipeptidases que atuam com as endo-CPs na hidrólise das globulinas são da classe serino e carboxi-SPs foram confirmadas na germinação de tricale (DRZYMALA; BIELAWSKI, 2009; DUNAEVSKY; BELOZERSKY; VOSKOBOYNIKOVA, 1993; DUNAEVSKY; BELOZERSKY, 1989), arroz (WASHIO; ISHIKAWA, 1994) e cevada (DEGAN et al., 1994).

No entanto, em *A. colubrina*, foi detectada expressiva atividade carboxi-CP em pH ácido com Abz-FRAK(Dnp)-OH, principalmente nos cotilédones; e carboxi-CPs (catepsina-B vegetal) são descritas no aleurona de trigo (CEJUDO et al., 1992) e de cevada (MARTINEZ, 2003). Portanto, é possível que catepsina-B vegetal seja a carboxipeptidase que atue junto com as fitopepsinas na hidrólise proteica em *A. colubrina*.

Considerando em conjunto as atividades endopeptidásica das fitopepsinas e carboxipeptidásica das CPs, detectadas em pH 4 e mais expressivas nos cotilédones após a germinação, ambas enzimas devem agir sequencialmente nos corpos proteicos e serem as enzimas responsáveis pela hidrólise proteica inicial em *A. colubrina*.

Por outro lado, nenhuma das peptidases neutro-alcálicas detectadas em *A. colubrina* parecem envolvidas na fase citoplasmática da degradação das proteínas de reserva. Segundo Shutov e Vaintraub (1987), amino- e dipeptidases citoplasmáticas, das classes metalo e serino, são as envolvidas na degradação final dos oligopeptídeos gerados pelas endo- e carboxipeptidases ácidas nos corpos proteicos. Apesar de atividades amino-MP e amino-SP terem sido detectadas em *A. colubrina* com F-MCA, o perfil tecido-temporal dessas

atividades, a preferência pelo substrato e os dados da literatura, indicaram como supostas enzimas as relacionadas à prófase meiótica – a metalo AMP1 (PEER et al., 2009) ou ao *turn-over* proteico – a serino TPPII (BOOK et al., 2005), ambas de *Arabidopsis*. Do mesmo modo, as atividades de CPs, MPs e SPs alcalinas detectadas com Z-FR-MCA indicaram, suposta e respectivamente, as enzimas fitocalpaína, matrixina e oligopeptidase-B, relacionadas, de modo geral, a processos de desenvolvimento.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho caracterizou-se como uma varredura da atividade proteolítica em sementes germinantes e estudos específicos com cada atividade detectada são necessários para determinar a identidade e função das peptidases envolvidas nestas atividades.

No entanto, houve a indicação de que fitopepsinas e catepsinas-B vegetais são as peptidases envolvidas nas fases iniciais da hidrólise das reservas proteicas em *A. colubrina* e isso difere das respectivas endopeptidases e carboxipeptidases comumente encontradas nas leguminosas cultivadas.

Também houve a indicação da presença de uma fitopepsina estável na escala de pH, o que é importante em processos industriais.

Esses dados reforçam a consideração de que a concentração dos estudos nas plantas cultivadas é um fator limitante ao conhecimento da proteólise na germinação e ao potencial de uso tecnológico das peptidases vegetais.

Sendo importante ampliar a detecção de peptidases vegetais sobre uma base genética diversificada, o método de varredura aqui empregado poderia ser aplicado em estudos comparativos da germinação entre diferentes espécies, bem como de outros processos biológicos, cuja detecção ampla de peptidases ativas seja o objetivo central.

REFERÊNCIAS

AHN, J. W. et al. Phytocalpain controls the proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 969-981, June 2004.

ANGELOVICI, R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. **Trends in Plant Science**, London, v. 15, n. 4, p. 211-218, Apr. 2010.

BARNABY, N. G. et al. Light-responsive subtilisin-related protease in soybean seedling leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 2, p. 125-134, Feb. 2004.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. California: Academic Press, 2004. 1 CD-ROOM

BEERS, E. P.; JONES, A. M.; DICKERMAN, A. W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. **Phytochemistry**, England, v. 65, n. 1, p. 43-58, Jan. 2004.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994.

BON, A. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BOOK, A. J. et al. Tripeptidyl peptidase II. An oligomeric protease complex from Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, n. 2, p. 1046-1057, June 2005.

BOYD, P. M. et al. Cleavage specificity of the subtilisin-like protease C1 from soybean. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1596, n. 2, p. 269-282, Apr. 2002.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Mar. 1976.
- CALLIS, J. Regulation of protein degradation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 845-857, July 1995.
- CAMBRA, I. et al. A cathepsin F-like peptidase involved in barley grain protein mobilization, HvPap-1, is modulated by its own propeptide and by cystatins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 695-709, July 2012.
- CAMPOS, V. A. C. et al. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, n. 12, p. 1815-1822, Dec. 2014.
- CEJUDO, F. J. et al. Analysis of the gibberellin-responsive promoter of a cathepsin B-like gene from wheat. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 20, n. 5, p. 849-856, Dec. 1992.
- CEZARI, M. H. et al. Cathepsin B carboxydipeptidase specificity analysis using internally quenched fluorescent peptides. **Biochemistry Journal**, London, v.368, n. 1, p. 365-369, Nov. 2002.
- CHEN, X.; PFEIL, J. E.; GAL, S. The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, n. 18, p. 4675-4684, Sept. 2002.
- DEGAN, F. D. et al. The expression of serine carboxypeptidases during maturation and germination of barley grain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 17, p. 8209-8213, Aug. 1994.
- DELORME, V. G. R. et al. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 3, p. 917-927, July 2000.
- DEMARTINI, D. R.; WLODAWER, A.; CARLINI, C. R. A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 521-532, 2007.

D'HONDT, K. et al. An aspartic proteinase present in seeds cleaves Arabidopsis 2 S albumin precursors *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 28, p. 20884-20891, Oct. 1993.

DRZYMALA, A.; BIELAWSKI, W. Isolation and characterization of carboxypeptidase III from germinating triticale grains. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, Shanghai, v. 41, n. 1, p. 69-78, Jan. 2009.

DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A. The role of cysteine proteinase and carboxypeptidase in the breakdown of storage proteins in buckwheat seeds. **Planta**, Berlin, v. 179, n. 3, p. 316-322, Oct. 1989.

DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A.; VOSKOBOYNIKOVA, N. E. In vitro reconstitution of the proteolytic system responsible for hydrolysis of the 13S globulin in buckwheat seeds. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v.324, n. 2, p. 216-218, June 1993.

DUNAEVSKY, Y. E.; SARBAKANOVA, S. T.; BELOZERSKY, M. A. Wheat seed carboxypeptidase and joint action on gliadin of proteases from dry and germinating seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 1323-1329, Apr. 1989.

DUNWELL, J. M.; PURVIS, A.; KHURI, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry**, England, v. 65, n. 1, p. 7-17, Jan. 2004.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 1066-1088, Aug. 2011.

FISCHER, J. et al. The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 43, n. 1, p. 83-101, May 2000.

GUTIERREZ-LUGO, M. T. et al. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 3, p. 263-265, Mar. 2004.

HARA, I.; MATSUBARA, H. Pumpkin (*Cucurbita sp*) seed globulin V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 21, n. 2, p. 219-232, 1980.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 29, p. 45-72, July 1960.

HE, F. et al. A. Protein storage vacuole acidification as a control of storage protein degradation in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 1059-1070, 2007.

HELLMANN, H.; ESTELLE, M. Plant development: regulation by protein degradation. **Science**, New York, v. 297, n. 5582, p. 793-797, Aug. 2002.

HERMAN, E. M.; LARKINS, B. A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 601-613, Apr. 1999.

HIBARA, K. I. et al. The ADAXIALIZED LEAF1 gene functions in leaf and embryonic pattern formation in rice. **Developmental Biology**, San Diego, v. 334, n. 2, p. 345-54, Oct. 2009.

HIRAIWA, N. et al. An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 246, n. 1, p. 133-141, May 1997.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Recommendations on biochemical & organic nomenclature, symbols & terminology etc.** London: School of Biological and Chemical Sciences, 2014. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

JOHNSON, K. L. et al. The phytocalpain defective kernel 1 is a novel Arabidopsis growth regulator whose activity is regulated by proteolytic processing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 10, p. 2619-30, Oct. 2008.

JUDICE, W. et al. Carboxydipeptidase activities of recombinant cysteine peptidases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 271, n. 5, p. 1046-1053, Mar. 2004.

JUNG, R. et al. The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, n. 3, p. 343-357, Mar. 1998.

KERVINEN, J. et al. Hydrolytic specificity of the barley grain aspartic proteinase. **Phytochemistry**, England, v. 32, n. 4, p. 799-803, Mar. 1993.

KISSELEV, A. F.; KAGANOVICH, D.; GOLDBERG, A. L. Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 25, p. 22260-22270, June 2002.

KNOBLOCH, P. J. Wari ritual power at Conchopata: an interpretation of *Anadenanthera colubrina* iconography. **Latin American Antiquity**, Washington, v. 11, n. 4, p. 387-402, Dec. 2000.

KULKARNI, A.; RAO, M. Biochemical characterization of an aspartic protease from *Vigna radiata*: Kinetic interactions with the classical inhibitor pepstatin implicating a tight binding mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1774, n. 5, p. 619-627, May 2007.

LANFRANCO, M. F. et al. Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of *Leishmania braziliensis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 91-100, Oct. 2008.

LID, S. E. et al. Mutation in the Arabidopsis thaliana DEK1 calpain gene perturbs endosperm and embryo development while over-expression affects organ development globally. **Planta**, Berlin, v. 221, n. 13, p. 339-51, June 2005.

LIDGETT, A. J. et al. Isolation and expression pattern of a cDNA encoding a cathepsin B-like protease from *Nicotiana rustica*. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 29, n. 2, p. 379-384, Oct. 1995.

LIU, X. et al. Soybean subtilisin-like protease involved in initiating storage protein degradation. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 55-68, Mar. 2001.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, Nov. 2008.

MAIDMENT, J. M. et al. Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 49, p. 34706-34710, Dec. 1999.

MARTINEZ, M. A. Cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells is under circadian control in leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 384, p. 951-959, Mar. 2003.

MAYNADIER, M. et al. Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of Cathepsin D inhibitors: a potential target for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 171, n. 2, p. 251-257, Oct. 2013.

MAZORRA-MANZANO, M. A. et al. Structure-function characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, England, v. 71, n. 5-6, p. 515-523, Apr. 2010.

McGEEHAN, G. et al. Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, n. 3, p. 1179-1183, July 1992.

MEROPS. The peptidase database. Disponível em: <<http://merops.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: 30 jul. 2014.

MIERNYK, J. A.; HAJDUCH, M. Seed proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 389-400, Apr. 2011.

MILISAVLJEVIC, M. D. et al. Two types of aspartic proteinases from buckwheat seed: gene structure and expression analysis. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, n. 9, p. 983-90, June 2008.

MIYAWAKI, M. et al. Changes in proteasome levels in Spinach (*Spinacia oleracea*) seeds during imbibition and germination. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 6, p. 998-1001, June 1997.

MORETÃO, M. P. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 93, n. 2-3, p. 189-197, May 2004.

MORRIS, K. et al. Regulation of seed germination in the close Arabidopsis relative *Lepidium sativum*: a global tissue-specific transcript analysis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 155, n. 4, p. 1851-1870, Apr. 2011.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and leishmania in host-parasite interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 1, n. 4, p. 455-460, Aug. 1998.

MÜNTZ, K. Deposition of storage proteins. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 38, n. 1-2, p. 77-99, Sept. 1998.

MÜNTZ, K. et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 362, p. 1741-52, Sept. 2001.

MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 605-622, Jan. 1996.

MÜNTZ, K. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 10, p. 2391-2407, 2007.

MÜNTZ, K.; BLATTNER, F. R.; SHUTOV, A. D. Legumains: a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propolypeptide processing and protein breakdown in plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, n. 12, p. 1281-1293, 2002.

MÜNTZ, K.; SHUTOV, A. D. Legumains and their functions in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 8, p. 340-344, Aug. 2002.

MUTLU, A. et al. The aspartic proteinase is expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds and localized in the protein bodies. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 75-84, Jan. 1999.

MUTLU, A.; GAL, S. Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 3, p. 569-576, Mar. 1999.

NAKABAYASHI, K. et al. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 697-709, Mar. 2005.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination: still a mystery. **Plant Science**, Limerick, v. 179, n. 6, p. 574-581, Dec. 2010.

ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex: a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry**, Washington, v. 29, n. 45, p. 10289-10297, Nov. 1990.

OSZYWA, B.; MAKOWSKI, M.; PAWELCZAK, M. Purification and partial characterization of aminopeptidase from barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 65, p. 75-80, Apr. 2013.

PEER, W. A. et al. Mutation of the membrane-associated M1 Protease APM1 results in distinct embryonic and seedling developmental defects in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 6, p. 1693-1721, June 2009.

PEREIRA, C. S. et al. Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases. **Protoplasma**, Leipzig, v. 232, n. 3-4, p. 203-213, 2008.

PRADO, D. E. Seasonally dry forests of Tropical South America: from forgotten ecosystems to anew phytogeographic unit. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 57, n. 3, p. 437-461, Nov. 2000.

PRETA, G. et al. The Enigma of tripeptidyl-peptidase II: dual roles in housekeeping and stress. **Journal of Oncology**, Wien, v. 2010, p. 01-10, 2010.

QI, X. et al. Characterization of a soybean beta-conglycinin degrading protease cleavage site. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 104, n. 1, p. 127-135, Jan. 1994.

RAJJOU, L. et al. The effect of (alpha)-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, n. 4, p. 1598-1613, Apr. 2004.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, p. 503-509, Jan. 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 248, p. 183-228, 1995b.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, London, v. 290, n. 1, p. 205-218, Feb. 1993.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of aspartic peptidases and those of unknown catalytic mechanism. **Methods in Enzymology**, New York, v. 248, p. 105-120, 1995a.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 244, p. 461-86, 1994b.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Families of serine peptidases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 244, p. 19-61, 1994a.

RECHSTEINER, M.; HOFFMAN, L.; DUBIEL, W. The multicatalytic and 26 S proteases. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 9, p. 6065-6068, Mar. 1993.

RIVETT, A. J. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. **The Biochemical Journal**, London, v. 291, n. 1, p. 1-10, Apr. 1993.

RUNEBERG-ROOS, P. et al. The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley lectin *in vitro*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 105, n. 1, p. 321-329, May 1994.

RUNEBERG-ROOS, P.; TÖRMÄKANGAS, K.; ÖSTMAN, A. Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase: a plant aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 202, n. 3, p. 1021-1027, Dec. 1991.

SALAS, C. E. et al. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, England, v. 69, n. 12, p. 2263-2269, Sept. 2008.

SALVADOR, S. M.; NOVO, C.; DOMINGOS, A. Evaluation of the presence of aspartic proteases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, n. 7, p. 893-898, May 2006.

SANTOS, J. S. et al. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 148, n. 1, p. 218-222, June 2013.

SARKKINEN, P. et al. Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. **Planta**, Berlin, v. 186, n. 3, p. 317-323, Feb. 1992.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 183-97, Dec. 2004.

SCHLERETH, A. et al. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1423-33, Aug. 2000.

SCHLERETH, A. et al. Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch (*Vicia sativa* L.) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 5-6, p. 718-727, Apr. 2001.

SENYUK, V. et al. Does an asparaginyl-specific cysteine endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings? **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 258, n. 2, p. 546-558, Dec. 1998.

SEO, S. B.; TAN-WILSON, A.; WILSON, K. A. Protease C2 in the continuing mobilization of soybean β -conglycinin seed proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1545, n. 1-2, p. 192-206, Feb. 2001.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 945-956, July 1995.

SHUTOV, A. D. et al. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 388, p. 1645-1654, July 2003.

SHUTOV, A. D.; VAINTRAUB, I. A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. **Phytochemistry**, England, v. 26, p. 1557-1566, 1987.

SILVA JÚNIOR, C. A. da et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 2222-2228, Sept. 2011.

SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 271, n. 11, p. 2067-2075, June 2004.

SMET, A. G. M. P. de; RIVIER, L. Intoxicating paricá seeds of the Brazilian maué Indians. **Economic Botany**, Bronx, v. 41, n. 1, p. 12-16, Jan./Mar. 1987.

SUTOH, K.; KATO, H.; MINAMIKAWA, T. Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 126, n. 4, p. 700-707, Oct. 1999.

TAMURA, T. et al. Differential expression of wheat aspartic proteinases, WAP1 and WAP2, in germinating and maturing seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 4, p. 470-477, Apr. 2007.

TANDANG-SILVAS, M. R. et al. Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglobulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: Insight into its physico-chemical properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, n. 2, p. 819-826, Nov. 2012.

TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 145, n. 1, p. 140-153, May 2012.

TERAUCHI, K. et al. Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, n. 8, p. 856-862, July 2006.

TIEDEMANN, J.; NEUBOHN, B.; MÜNTZ, K. Different functions of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization, during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). **Planta**, Berlin, v. 211, n. 1, p. 1-12, June 2000.

TÖRMÄKANGAS, K. et al. Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. **Planta**, Berlin, v. 195, n. 1, p. 116-125, Nov. 1994.

TSUJI, A. et al. Molecular cloning and expression analysis of novel wheat cysteine protease. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1670, n. 1, p. 84-89, Jan. 2004.

TSUJI, A.; YUASA, K.; MATSUDA, Y. Identification of oligopeptidase B in higher plants. Purification and characterization of oligopeptidase B from quiescent wheat embryo, *Triticum aestivum*. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 136, n. 5, p. 673-681, Nov. 2004.

VAN DER HOORN, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 191-223, 2008.

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas proteolíticas. In: BON, A. P. S. et al. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 153-173.

WASHIO, K.; ISHIKAWA, K. Organ-specific and hormone-dependent expression of genes for serine carboxypeptidases during development and

following germination of rice grains. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 105, n. 4, p. 1275-1280, Aug. 1994.

WILSON, K. A. et al. Differential proteolysis of glycinin and β -conglycinin polypeptides during soybean germination and seedling growth. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 82, n. 1, p. 71-76, Sept. 1986.

WROBEL, R.; JONES, B. L. Appearance of endoproteolytic enzymes during the germination of barley. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 100, n. 3, p. 1508-1516, Nov. 1992.

YANO, H. et al. Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germinating rice. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 8, p. 879-883, Aug. 2001.

ZAKHAROV, A. et al. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 406, p. 2241-2249, Oct. 2004.

ZWICKL, P. et al. Primary structure of the thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function and evolution of the multicatalytic proteinase. **Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 4, p. 964-972, Feb. 1992.